Aus dem Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med. Hans-Peter Koepchen

GEZIELTE ENTNAHME VON HIRNSTAMMGEWEBE AUS DEM RESPIRATORISCHEN PRÄDILEKTIONSGEBIET DER RATTE UND DESSEN ABLEITUNG IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

1978

vorgelegt von
Horst Benstein
aus Minden/Westf.

1977

Aus dem Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Koepchen

GEZIELTE ENTNAHME VON HIRNSTAMMGEWEBE AUS DEM RESPIRATORISCHEN PRÄDILEKTIONSGEBIET DER RATTE UND DESSEN ABLEITUNG IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Benstein
aus Minden/Westf.

1977

Referent: Professor Dr. Albrecht Schott
Korreferent: Professor Dr. H. Schneider

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 23. Febr. 1978

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544718_0004

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	7
1. Historischer Oberblick der peripheren Atmung	7
2. Historischer Oberblick der zentralnervösen Atmungssteuerung	7
2.1 Autonomie	7
2.2 Automatie	9
3. Elektrophysiologische in vitro-Untersuchungen der Medulla oblongata	12
B. EIGENE FRAGESTELLUNG	14
C. METHODE DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN ABLEITUNG	16
1. Präparation	17
2. Ableitungen	18
2.1 10 µ Platin-Quarz-Elektrode	18
2.2 Extraktionselektrode	19
3. Registriertechnik	20
4. Versuchsablauf	23
D. ERGEBNISSE	26
1. Stereotaktische Lokalisation respiratorischer Aktivitäten mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden	26
2. Ableitungen respiratorischer Aktivitäten mit der Extraktionselektrode vor und während der Entnahme	26
3. Neuronale Aktivität in vitro	29
3.1 Rhythmische Entladungsmuster	31
3.1.1 Vergleich der rhythmischen Entladungsmuster mit den Periodendauern narkotisierter, operierter Tiere und wacher Tiere	40
3.2 Rhythmen 2. Ordnung	43
3.3 Unregelmäßige Entladungsmuster	45
3.4 Kontinuierlich erscheinende Entladungsmuster	45
4. Artefaktausschluß	47
4.1 Strychninapplikation	47
4.2 Artefaktidentifizierung am Speicher-KO	48
E. GEWEBEKULTUR	50
1. Technik der Zellkultivation	50
2. Histologische Verfahren	51

3. Ergebnisse 53
3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen 53
3.2 Histologische Färbungen 59
3.2.1 Nissl-Färbung nach PISCHINGER (1968) 59
3.2.2 Neurofibrillendarstellung nach BODIAN (1968) 60
3.2.3 Doppelfärbung nach PISCHINGER und BODIAN 62

F. DISKUSSION 64

G. ZUSAMMENFASSUNG 71

H. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 73

I. LITERATUR 74

LEBENSLAUF

A. EINLEITUNG

1. Historischer Überblick der peripheren Atmung

Die ersten Erklärungsversuche der tierischen und menschlichen Atmung reichen zurück bis ins klassische Altertum mit ihrer Humoralphysiologie und den Vorstellungen von den elementaren Eigenschaften der Säfte. Die Hippokratiker nahmen an, daß das Pneuma zur blutleeren linken Herzkammer gelangt und dort die Körperwärme erzeugt.

GALEN hingegen beobachtete, daß der linke Ventrikel Blut enthält. Die eingeatmete Pneuma sollte nun die Aufgabe haben, das überhitzte Blut abzukühlen. GALEN und ERASISTRATOS unterschieden in der Folgezeit mehrere Arten von Pneuma und schrieben ihnen auch unterschiedliche Aufgaben zu. GALEN's Vorstellungen beherrschten das medizinische Denken des ganzen Mittelalters, erst durch die Iatrophysiker und Iatrochemiker entstanden neue Theorien.

Die Engländer BOYLE, HOOK, LOWER und MAJOW wirkten bahnbrechend, indem sie der Atmung eine chemische Beeinflussung des Blutes zuschrieben.

Die Entdeckung der bei der Atmung beteiligten Gase O_2 und CO_2 (1771-1774) erlaubte es LAVOISIER (1777-1789), die "Sauerstoffverbrennungstheorie" zu formulieren. 1785 führte LAVOISIER den ersten "Respirationsversuch" durch, im Anschluß daran begann dann die Erforschung der Detailfragen (Anfang des 19. Jahrhunderts). H.G. MAGNUS: Quantitative Untersuchung der Blutgase; E. PFLÜGER: Entdeckung der intramolekularen Atmung; J.S. HALDANE untersuchte die Chemie der Atmung und deren Regulation; C. BOHR die Änderung des Sauerstoffbindungsvermögens in Abhängigkeit des Blut-pH.

2. Historischer Überblick der zentralnervösen Atmungssteuerung

2.1 Autonomie

Verglichen mit der historischen Entwicklung der Erforschung der inneren und äußeren Atmung müssen uns die ersten Untersuchungsergebnisse der zentralnervösen Atemsteuerung wegen der gedanklichen und methodischen Schwierigkeiten als sehr früh erscheinen. Die einfache Feststellung, daß die höheren Tierarten nach der Dekapitation keine Rumpfatmung mehr zeigten, legte schon

die Annahme nahe, daß die Atemrhythmik innerhalb des ZNS entsteht. Diese Forderung wurde expressis verbis erstmals von LE GALLOIS erhoben, noch bevor er 1812 mit seinem klassischen Durchtrennungsversuch den klaren experimentellen Beweis für die Lokalisation dieses Atemzentrums im verlängerten Mark erbrachte.

FLOURENS (1842) wies mit seinem Begriff des "nœud vital" erstmals auf die Autonomie des Atemzentrums hin. Damit wurde erstmals die Selbsterregung bestimmter Hirnstammareale angenommen, im Gegensatz zu den schon damals bestehenden Vorstellungen einer Ursächlichkeit irgendwelcher nicht primär nervaler Faktoren. Die Annahme, daß milieubedingte "Reize", insbesondere die chemischer Art, die Ursache für die Atmung sein sollten, war derart verbreitet (HALL, 1837; VOLKMANN, 1841; SCHIFF, 1858/59), daß es sich ROSENTHAL und seine Nachfolger zum Ziel setzten zu beweisen, daß die Atmung auch nach Ausschaltung sämtlicher in Frage kommender peripherer Afferenzen und höherer zentraler Einflüsse weiter bestehen bleibt. 1865 gelang es ROSENTHAL, Halsmark und Medulla oblongata völlig zu deafferentieren, verbunden mit einer Durchtrennung des Rückenmarks oberhalb von C_1. Trotz dieses Kardinalversuchs wurden die Erklärungsversuche der Entstehung der Atmung durch rhythmische reflektorische Afferenzen nicht aufgegeben (LANGENDORFF, 1878; HERING, 1893; GESELL und MOYER, 1935; GARCÍA RAMOS, 1959).

Zu jener Zeit wurde der Hinweis von LE GALLOIS (1812), der schon zwischen einem In- und einem Exspirationszentrum unterschied, unberücksichtigt gelassen. Ebenso wurde zwischen Autonomie und Automatie nicht unterschieden und als ROSENTHAL (1862) die Automatie zu definieren suchte als "welche aus natürlichen, in den Zentralorganen liegenden Ursachen erfolgend" entsteht, definierte er damit das, was wir heute als Autonomie verstehen.

In der Folgezeit war es dann besonders GAD (1886), der sich um eine differenzierte Analyse der Autonomie des Atemzentrums bemühte. Dabei schrieb er die Potenz der Autonomie ausschließlich dem Inspirationszentrum zu und maß dem Exspirationszentrum lediglich reflektorische Bedeutung bei, eine Frage, die bis heute nicht geklärt ist.

Einen weiteren, einfachen Hinweis für die Autonomie des bulbären Atemzentrums

erbrachte BIENFAIT (1892) und später HEYMANS und HEYMANS (1927), indem sie zeigten, daß die sowohl vom höheren Hirnstamm als auch vom Rückenmark isolierte Medulla oblongata noch typische Atmungsbewegungen des Kehlkopfes hervorrufen kann.

2.2 Automatie

Die ersten Hinweise dafür, daß der Atemrhythmus kein primärer Zellrhythmus von (synchronisierten) Einzelzellen ist, sondern ein komplexerer intrazentraler Schaltmechanismus sein müßte, ergab sich schon aus dem Experiment von LE GALLOIS (1812). Der beim suprabulbären Hirnstammschnitt gefundene inspiratorische Atemstillstand (MARCKWALD und KRONECKER, 1880) wurde später von MARCKWALD (1887) so interpretiert, daß die eigentliche Autonomie eine primär inspiratorisch-tonische sei, die dann reflektorisch (afferenter Vagus und höhere Zentren) zum Rhythmus wird, d.h. die Atemrhythmik entsteht durch rhythmische Unterbrechung der inspiratorischen Population.

Zuvor versuchten MÜLLER (1837) und vor allem ROSENTHAL (1862) die Atemrhythmik dadurch zu erklären, daß die Inspiratoren einen "zentralen Widerstand" überwinden müßten und so die Atemrhythmik im Sinne eines Kippschwingsystems entsteht.

Daneben gab es aber auch schon damals Vorstellungen, die dem Atemzentrum analog den Sinuszellen des Herzens Schrittmacherfunktion zuschrieben (LANGENDORFF, 1887; KNOLL, 1886). Auf die Erklärungsversuche der Atemrhythmik auf der Basis periodischer Reflexe wurde schon im vorigen Kapitel hingewiesen. Den letzten großen Versuch vor der Jahrhundertwende, den Aktivitätswechsel von den Inspiratoren zu den Exspiratoren und umgekehrt zu erklären, machte LEWANDOWSKY (1896), der zeigte, daß die afferente Vagusreizung am Anfang der Inspirationsphase wenig und am Ende immer mehr inspirationshemmende Wirkung hat und zog daraus den Schluß, daß die "Verminderung der exspiratorischen Energie" bzw. die "Erschöpfung des Atemzentrums" die Inspirationsphase beende und die zusätzlichen Vagusafferenzen dann die Exspiration herbeiführen.

Ausgehend von den Überlegungen MARCKWALD's (1887) und der Annahme LANGENDORFF's (1879), das Atemzentrum habe die "Bedingung der regelmäßigen Abwechslung von In- und Exspiratoren in sich selbst", versuchte dann LUMSDEN, das Atemzentrum

in seiner Komplexität in mehrere "Unterzentren" zu unterteilen und die Bedeutung der verschiedenen Hirnstammabschnitte und die normale Atemrhythmik festzustellen. Dabei entwickelte LUMSDEN aufgrund seiner klassichen Durchtrennungsversuche (1923 a, 1923 b) die Theorie, daß ein (automatisches) pneumotaktisches Zentrum ein apneustisches Zentrum rhythmisch hemme, so daß es dadurch auf dem Boden einer tonisch-respiratorischen Aktivierung zur Atemrhythmik käme. Die Idee, daß der normale Atemrhythmus durch die Wechselwirkung mehrerer Teilzentren entstehe, wurde dann von PITTS, MAGOUN und RANSON (1939 a, 1939 b) erweitert, indem sie dem inspiratorisch apneustischen Zentrum nach einer Aktivierung des pneumotaktischen Zentrums durch eine zeitliche Verzögerung eine Selbsthemmung zuschrieben. HOFF und BRECKENRIDGE (1949) und BRECKENRIDGE und HOFF (1950) stellten fest, daß die Apneusis nicht durch Ausschaltung des pneumotaktischen Zentrums bei gleichzeitiger Vagotomie, sondern durch eine tiefer gelegene Durchtrennung weiterer Hirnnerven, vor allem des 9., hervorgerufen werde. Deshalb sprachen sie der Medulla oblongata allein die Fähigkeit zur Rhythmusbildung zu. Weitere in der letzten Zeit durchgeführte Durchtrennungsversuche (HUKUHARA et al., 1951; WANG et al., 1957; ONDINA et al., 1960) ergaben keine wesentlichen Gesichtspunkte für die Erklärung der zentralen Atemtätigkeit.

Mit den queren Durchtrennungen war nur eine grobe Lokalisation des Atemzentrums, aber keine genaue Aussage über eine räumliche Verteilung von eventuellen Teilfunktionen und deren Zusammenwirken bei der Rhythmogenese möglich.

Erst durch die Ende des 19. Jahrhunderts eingeführte Methode, die im Millivoltbereich liegenden Potentialschwankungen bei der Nervenerregung abzuleiten, führte dazu, genaueres über Lage und Funktion atemrhythmisch tätiger Substrate auszusagen.

Auf der Hypothese von LUMSDEN (1923 a, 1923 b) aufbauend, daß ein großer Teil des unteren Hirnstammes mit einem definierten Unterzentrum und pontinen Schrittmacher für die Rhythmogenese notwendig sei, postulierten BERTRAND und HUGELIN (1971), HUGELIN und BERTRAND (1973) und BERTRAND et al. (1974) mit Hilfe der kombinierten Ableit- und Registriertechnik, daß pontine Übergangsneurone den Wechsel zwischen In- und Exspiration, bzw. Ex- und Inspiration, beeinflussen, die Rhythmusbildung selber jedoch in der Medulla oblongata lokalisiert sei.

Die Ansicht, daß für die Rhythmogenese pontine Schrittmacher notwendig sind, wurde aufgrund der Ergebnisse der weitergehenden Lokalisations- und Isolationsversuche angezweifelt. Es besteht die Vorstellung, daß ein kleiner Teil des unteren Hirnstammes, in der Gegend des Obex, auch nach Isolierung vom pontinen Gebiet zur Rhythmogenese fähig ist. In vielen dieser Experimente wurde der Hirnstamm nicht nur vom Pons isoliert, sondern auch die Afferenzen der Hirnnerven ausgeschaltet (HUKUHARA, 1973; SALMOIRAGHI und BURNS, 1960 b).

Die von vielen Autoren (z.B. BATSEL, 1964; BAUMGARTEN et al., 1957; HABER et al., 1957; KRUSCHE, 1977; MERRILL, 1970; NELSON, 1959; PHILIPP, 1973; PHILIPP und KLOSSENDORF, 1969; SALMOIRAGHI und BURNS, 1960 a) durchgeführten Untersuchungen am unteren Hirnstamm haben nur die Frage der Lokalisation der atemrhythmisch tätigen Neurone im wesentlichen geklärt, ohne die Grundfragen der Rhythmogenese, nämlich die Frage nach der Selbstentstehung und Selbstbegrenzung zentralnervöser atemrhythmischer Aktivitäten beweisenderklären zu können.

Einen wichtigen Schritt, diese Frage zu lösen, stellt die Isolation von Teilen des in situ belassenen rhythmogenetischen Komplexes, mittels Durchschneidungs- und/oder Denervierungsexperimenten dar.

Zum erstenmal gelang es ADRIAN und BUYTENDIJK (1931), am völlig isolierten Hirnstamm des Goldfisches rhythmische Aktivitäten nachzuweisen. Derartige Atmungsäquivalente konnten auch von HUKUHARA und OKADA (1956) am Hirnstamm von Wels und Goldfisch und von BAUMGARTEN und SALMOIRAGHI (1962) ebenfalls am Goldfisch gezeigt werden. BUCHER (1945) gelang es dann, von der isolierten und künstlich durchströmten Medulla des Kaninchens und EULER und SÖDERBERG (1952) von dem in situ belassenen, aber vollständig denervierten Rhombencephalon eine der respiratorischen analoge elektrische Aktivität abzuleiten.

SALMOIRAGHI und BURNS (1960 b) isolierten die in situ belassene Medulla der Katze durch Decerebrierung auf Höhe der caudalen Zweihügel, durch Spinalisierung auf Höhe des ersten Halssegmentes und beidseitige Durchschneidung sämtlicher in Frage kommender Hirnnerven, zusätzlich spalteten sie die Medulla in sagittaler Richtung, entlang der Medianlinie. Sie fanden bei Einstichen mit einer Mikroelektrode, nach zunehmender Isolierung, immer weniger

rhythmische Aktivität (letztlich nur noch 10 %). Wegen dieser großen zahlenmäßigen Aktivitätsabnahme deuten diese Versuche auf eine Potenz zur Automatie der Medulla hin, sind jedoch als Hinweis für die Notwendigkeit afferenter und zentralnervöser Einflüsse zur Rhythmogenese zu werten, weil nach unspezifischer mechanischer Reizung der caudalen Schnittfläche eine deutliche rhythmische Aktivitätszunahme erfolgte.

Einen weiteren Beitrag zur Frage der Autonomie erbrachte HUKUHARA (1973), der bei gleichzeitiger Ableitung einer pontinen und einer bulbären respiratorischen Einheit nach Abtrennung des Pons von der Medulla weiterfeuernde Aktivität der bulbären Einheit fand, während die pontine den Atemrhythmus verlor bzw. schwieg. Diese Arbeit spricht dafür, daß die Medulla unabhängig von supramedullären Einflüssen einen Atemrhythmus erzeugen kann (siehe auch weiter oben, BERTRAND und HUGELIN, 1971; HUGELIN und BERTRAND, 1973; BERTRAND et al., 1974). Die Frage, ob aber diese Autonomie eine Eigenschaft der Einzelzelle oder eines in rhythmischen und/oder tonischen Wechselbeziehungen stehenden Zellverbandes ist, konnte auch von ihnen nicht entschieden werden.

In all diesen Experimenten war trotz weitestgehender Isolierung aber stets der aktivierende Zufluß von den Receptoren der ventralen Oberfläche der Medulla oblongata erhalten, der nach neueren Untersuchungen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Rhythmizität spielt (LOESCHCKE, KOEPCHEN, 1958; SCHLAEFKE, LOESCHCKE, 1967; SCHWANGHART et al., 1974).

Aufbauend auf den Untersuchungen von ADRIAN und BUYTENDIJK (1931), daß ein total isoliertes Stück Hirnstamm "respiratorische" Rhythmen produzieren kann, versuchten wir, die Frage des nötigen Umfangs von Afferenzen für die Rhythmogenese weiterzuführen, indem wir definierte Isolationen von respiratorischen Arealen durchführten.

3. Elektrophysiologische in vitro-Untersuchungen der Medulla oblongata

Einen Hinweis dafür, daß Teile der Medulla oblongata zu einer Spontanrhythmik fähig sein könnten, liefern schon Befunde aus dem Bereich der Gehirngewebekulturen embryonaler Tiere.

CUNNINGHAM (1961 a) leitete mit Elektroden, die in dünnen Schnitten embryona-

len medullären Gewebes eingebettet waren, kontinuierliche, spontane Aktivitäten bereits 12 Stunden nach Explantation ab. Die dabei gefundenen und als typisch bezeichneten Aktivitäten traten in Gruppen von 30 Signalen mit Intervallen von 4 min Dauer auf. Diese Aktivitäten konnten über mehr als 72 Stunden nach der Explantation abgeleitet werden, wobei eine Zunahme der Intervalldauer und eine Abnahme der Signalanzahl zu verzeichnen war.

CRAIN et al. (1968) und CRAIN (1973) isolierte den medialen Teil der rostralen Medulla eines 14 Tage alten Mäusefoetus und ließ dieses Gewebe in der Gewebekultur mit Teilen des Großhirns zusammenwachsen. Er fand spontane rhythmisch wiederkehrende Entladungsmuster, die nach Bildung interneuronaler Verbindungen in vitro nach 3 Wochen synchron mit dem Großhirn feuerten. In einigen Fällen wurden sich wiederholende Spikeentladungen in der Medulla sogar beobachtet, wenn das Großhirngewebe keine Aktivitäten zeigte. In anderen Fällen waren diese Entladungen dauerhafter und weniger scharf getrennt, wenn das Großhirngewebe untätig blieb.

1972 wurden von CORNER und CRAIN systematische Ableitungen an foetalen Rükkenmark- und Medullaexplantaten von Mäusen und Ratten durchgeführt. Die dabei gefundenen zeitlichen Muster spontaner Entladungsgruppen waren sehr unterschiedlich. Unregelmäßige Aktivitätsmuster wurden häufig gefunden. Daneben konnten kontinuierliche Aktivitäten und Entladungsgruppen von 0,1 s bis zu mehreren Sekunden Dauer, die in regelmäßigen Intervallen von 1 s bis zu 10 s erschienen, abgeleitet werden.

Davon ausgehend, daß kleine Gruppen embryonaler Nervenzellen in der Lage sind, komplexe neuronale Netzwerke zu bilden (CRAIN, 1964, 1969; CRAIN und BORNSTEIN, 1964; CRAIN und PETERSON, 1964, 1967) und die in vitro gefundenen Entladungsmuster (CORNER, CRAIN, 1972; SCHLAPFER et al., 1972) eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit den in situ abgeleiteten Aktivitäten aufweisen (PROVINE et al., 1970; PROVINE, 1972; ECCLES et al., 1966; siehe auch Überblick bei CRAIN, 1966) können Kulturen von unentwickeltem ZNS-Gewebe ein brauchbares Modell für die Erforschung der komplexen Verhältnisse und fundamentalen Mechanismen des ZNS sein. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, daß auch unter optimalen Bedingungen in der Gewebekultur strukturelle und funktionelle Abnormalitäten möglich sind und somit die Ergebnisse der obengenannten Autoren nicht

zwangsläufig die Verhältnisse in situ darstellen müssen.

Es stellt sich die Frage, ob Gewebe von 8-17 Tage alten Ratten nach vollständiger Isolation vom Tier spezielle, vorher identifizierte Funktionen in vitro beibehalten kann. Dazu ist zunächst zu klären, ob das Nervengewebe dieser Altersgruppe überhaupt zur Migration fähig ist.

Explantationen der Medulla oblongata von neugeborenen und bis zu 4 Tage alten Ratten liegen bereits vor (HÖSLI und HÖSLI, 1970; HÖSLI et al., 1971; HOGUE, 1946; LUMSDEN, 1968 u.a.). In dieser Altersgruppe ergaben sich keine Schwierigkeiten in der Anzüchtung von Nervengewebe.

Autoren, die versuchten, adultes ZNS-Gewebe zu kultivieren (HOGUE, 1953; OKAMOTO, 1958; COSTERO und POMMERAT, 1951; GEIGER, 1958, 1963), fanden auswandernde Zellen, die sie aufgrund der langen verzweigten Fortsätze und anderer zytologischer Verhaltensweisen, z.B. Synapsenbildung und Myelinisation (GEIGER, 1963) als Neurone charakterisierten. Diese Ergebnisse wurden von MURRAY (1965) und CRAIN (1966) in Frage gestellt, da ausreichende histologische und elektrophysiologische Untersuchungen bei den oben genannten Autoren fehlten.

Ausgehend davon, daß im Rahmen der Ontogenese, die Migrationsfähigkeit abnimmt (SOUKUPOVA und HOLECKOVA, 1964), aber andererseits von bis zu 4 Tage alten Ratten eine erfolgreiche Anzüchtung von Nervengewebe gelang, versuchten wir, das entnommene Nervengewebe von Tieren der Altersgruppe 8-17 Tage zu kultivieren und Neurone aus dem respiratorischen Prädilektionsgebiet mit den histologischen Methoden (Nissl-Färbung, Silber-Imprägnation) nachzuweisen.

B. EIGENE FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Frage der Autonomie und Automatie des Atemzentrums leisten. Ausgehend von den zahlreich durchgeführten Isolations-Denervierungs- und/oder Durchtrennungsversuchen anderer Autoren (siehe Einleitung) und der Tatsache, daß ein total isoliertes Stück

Hirnstamm "respiratorische" Rhythmen hervorbringen kann (ADRIAN Und BUYTENDIJK, 1931), befaßten wir uns mit folgenden Fragen:

1. Wo sind die respiratorischen Neurone in der Medulla oblongata der 8-17-tägigen Ratte lokalisiert?
2. Sind kleine Teile des atemrhythmischen Substrates der Medulla oblongata nach totaler Isolation, in der Lage, rhythmische Aktivitäten in vitro hervorzubringen und sind diese Aktivitäten mit in situ-Verhältnissen vergleichbar?
3. Sind Afferenzen für die Rhythmogenese unabdingbar?
4. Ist eine reziproke Verschaltung zwischen in- und exspiratorischen Neuronen eine unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung eines Rhythmus?
5. Besteht die Möglichkeit, funktionell identifiziertes Nervengewebe, von Tieren der Altersgruppe 8-17 Tage, nach der Ableitung in vitro in der Gewebekultur zu züchten?

Grundvoraussetzung für die Bearbeitung der oben angeführten Punkte 1.-4. war die Entwicklung einer Gewebsentnahmemethode, die die Voraussetzung erfüllt, medulläres Gewebe unter funktioneller Kontrolle möglichst schonend zu entnehmen und extracorporal abzuleiten.

Für die Wahl der Ratte als Versuchstier sprachen folgende Gründe:

1. Ein relativ einfacher operativer Zugang zum Präparat,
2. Innerhalb der Arbeitsgruppe bestehende umfassende Kenntnis der respiratorischen Areale der Ratte und deren Ableitmethoden (KRUSCHE, 1977; SCHOTT et al., 1972),
3. Erfahrung in der Anzüchtung von Nervengewebe der Medulla oblongata neugeborener Ratten, als Basis für definierte ZNS-Untersuchungen in der Gewebekultur.

C. METHODE DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN ABLEITUNG

Versuchstiere

Die Experimente wurden an 16-39 g schweren Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts durchgeführt. Dieses Gewicht entspricht ungefähr dem Alter von 8-17 Tagen. Tiere dieser Altersstufe wurden verwendet (s.u.), da einerseits mit der Extraktionselektrode Ableitversuche durchgeführt, andererseits aber auch das entnommene Gewebe in der Gewebekultur weiteren morphologischen und histologischen Untersuchungen zugeführt werden sollte.

Um gezielt Gewebe aus respiratorischen Arealen des unteren Hirnstammes von Ratten entnehmen zu können, war jedoch eine vornergehende Lokalisation mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden unumgänglich. Untersuchungen von KRUSCHE (1977) an neugeborenen Ratten (maximal 48 h alt, 6-10 g schwer) führten zu dem Befund, daß unter Urethan-Narkose mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden im unteren Hirnstamm keine rhythmischen Aktivitäten abzuleiten waren. Eigene Ableitversuche bestätigten diesen Befund. Eine zufriedenstellende Ableitung mit der angegebenen Methode gelang erst bei Ratten, die ca. 8 Tage alt waren (16 g). So stellen die verwendeten Ratten der Altersgruppe 8-17 Tage einen Kompromiß zwischen den neurophysiologischen Möglichkeiten und den Notwendigkeiten der Nervenzellgewebekultur dar.

Narkose

Die Versuchstiere wurden mit 1,5 g/kg Körpergewicht Urethan (25 %-ige Lösung) intraperitoneal narkotisiert. Diese Dosis erzeugt bei jungen Tieren im Gegensatz zu adulten nur eine flache Narkose. Wie es sich bei zahlreichen Versuchsverläufen zeigte, besteht eine Relation zwischen Narkosetiefe und der Aktivität atemrhythmisch tätiger Neurone. Bei hoher Dosierung des Narkosemittels waren nur selten oder keine neuronalen Aktivitäten mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden ableitbar. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von KRUSCHE (1977), dem es z.B. unter intermittierender Halothannarkose (nur während der flachen Narkosephase) gelang, neuronale Aktivität bei neugeborenen Ratten abzuleiten. Aus diesem Grunde erwies es sich als sinnvoll, die Narkose möglichst flach zu wählen.

Temperaturregulierung

Die Narkose schränkt die normale Temperaturregulierung der Tiere stark ein. Während des Versuchsablaufes würde es zu einer erheblichen Abkühlung der normalen Körpertemperatur kommen. Um die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant auf 37° C zu halten, wurden diese auf einem beheizbaren und über einen Thermofühler regulierbaren Operationstisch fixiert.

1. Präparation

Trachealtubus .

Um während des Versuchsablaufes die abgeleiteten neuronalen Aktivitäten der Atmungsphase zuordnen zu können, wurde bei den Versuchstieren ein Trachealtubus gelegt. Die Trachea wurde durch einen 4-5 mm langen Schnitt vom Schildknorpel bis zum oberen Sternalrand freigelegt, wobei die ventrale Halsmuskulatur in Längsrichtung gespalten wurde. Unterhalb des Schildknorpels wurde die Trachea durch einen T-Schnitt eröffnet und ein ca. 1,5 cm langer PVC-Schlauch mit eingebautem NTC-Widerstand als Trachealtubus (Widerstand mit negativem Temperaturkoeffizienten) zur Atemregistrierung eingeführt.

Präparation der Medulla oblongata

Zur Freilegung der Medulla oblongata wurde das Tier in Bauchlage gebracht und der Kopf des Tieres durch eine Halterung so fixiert, daß die dorsale Oberfläche der Medulla oblongata eine nahezu horizontale Position einnahm.

Die Halterung des Kopfes bestand aus Ohrenstiften, deren angespitzte Enden durch Aufsatz von Gummistopfen (8 x 12 x 20 mm) verbreitert wurden. In die Gummistopfen wurden je 3 Insektennadeln so eingesetzt, daß sie etwa 1 mm herausragten. Mit Hilfe dieser herausragenden Insektennadeln wurde der Kopf in Höhe der Ohrmuscheln fixiert.

Zur Freilegung der dorsalen Oberfläche der Medulla oblongata wurde von kurz oberhalb der Protuberantia occipitalis externa bis etwas unterhalb des 1. Halswirbels und seitlich bis an die Grenzen des M. splenius capitis ein rechteckiger Bereich der Nackenhaut abgetragen. Dabei wurde das kräftige Ligamentum nuchae mitentfernt, so daß die Mm. trapecius (Pars descendens) und sternocleidomastoideus freilagen.

Die Nackenmuskulatur wurde, um Blutungen auf ein Minimum zu beschränken, in zwei Lagen abgetragen. In der ersten Lage wurden die Mm. trapecius (Pars descendens), sternocleidomastoideus, splenius capitis und semispinalis capitis direkt von der Hinterhauptschuppe an ihren Sehnenansätzen abgeschnitten. In der zweiten Muskellage wurden die Mm. rectus posterior major et minor, rectus capitis lateralis, oblicuus capitis superior et inferior unter mikroskopischer Kontrolle (25-fach) an ihren sehnigen Ansätzen durchtrennt. Besonders blutungsarm verlief der Eingriff, wenn die unmittelbar unter der kurzen Nackenmuskulatur gelegene Dura mater gleichzeitig T-förmig gespalten und nach lateral aufgeklappt wurde. Mit einer kleinen Schere wurde die Hinterhauptschuppe vom Foramen magnum bis fast zur λ-Naht abgetragen. Mit Hilfe von Babyklemmen wurde der Operationsbereich freigehalten, so daß die dorsale Oberfläche der Medulla oblongata sichtbar wurde. Der aus dem Subarachnoidalraum hervorquellende Liquor wurde abgetupft und die Arachnoidea unter Zuhilfenahme einer feinen Iridectomieschere, unter Schonung eventuell vorhandener Gefäße (Seitenäste der A. spinalis posterior) entfernt. Trotz der Schwere des Eingriffs traten nur kleinere Blutungen auf, die leicht, durch Auflage von Tupfern, zum Stillstand gebracht werden konnten.

Die Pia mater encephali ist Trägerin der Blutverzweigungen und liegt, wie überall am Gehirn, auch der Oberfläche der Medulla oblongata dicht an. Obwohl sie relativ dünn ist, bereitete sie doch wegen ihrer Festigkeit und Elastizität für den weiteren Versuchsablauf erhebliche Schwierigkeiten, da ein Durchstoßen der Pia mater mit der Extraktionskanüle nur unter Quetschung des darunterliegenden Nervengewebes gelang. Die Versuche, die Pia mater zu entfernen, endeten bei der kleinen Ratte mit einer diffusen Massenblutung. Die experimentellen Schwierigkeiten wurden umgangen, indem die Pia mater im Entnahmebereich vorsichtig mit einer Insektennadel durchstochen und punktuell entfernt wurde.

2. Ableitungen

2.1. 10 µ Platin-Quarz-Elektrode

Die extrazelluläre Aktivität der respiratorischen Neurone wurde mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden (SCHOTT et al., in Vorbereitung) abgeleitet. Eine indifferente Elektrode wurde in der Nähe der Ableitstelle angebracht.

Die Elektrode besteht aus einem Platindraht mit einem Durchmesser von 10 µ, der mit einem Quarzmantel am unteren Ende ca. 1,2 cm lang isoliert ist. Der Gesamtdurchmesser der Elektrode betrug ca. 30 µm.

Für die Ableitungen wurden die Elektroden in einem Elektrodenhalter (BAUMGARTEN, 1957; KOEPCHEN und LANGHORST, 1967) befestigt. Dabei wurde der untere glasisolierte Teil der Elektrode in einer Drahtschlinge, die Cethylalkohol enthielt, geführt, so daß ein starres Eindringen in den Hirnstamm gewährleistet war. Bei der Ableitung atemrhythmischer neuronaler Aktivität wurde die Drahtschlinge durch Gleichstrom erhitzt und der Cethylalkohol zum Schmelzen gebracht, so daß die Elektrode frei der Gewebspulsation folgen konnte und somit Reibungsartefakte vermieden werden konnten.

Der Elektrodenhalter wurde über eine Halterung an einem Mikromanipulator (Fa. Leitz) befestigt. Die Koordinaten der Manipulatorstellung ermöglichten eine stereotaktische Lokalisation der abgeleiteten Aktivitäten.

Über den Elektrodenhalter waren die Elektroden mit einem kurzen, verlustarmen Koaxialkabel über einen Vorverstärker an den Kathodenstrahloscillographen (Fa. Tektronix) angeschlossen (siehe genauere Angaben unter 3. Registriertechnik).

2.2 Extraktionselektrode

Die Extraktionselektrode diente zur Entnahme und gleichzeitig als Ableitelektrode. Sie besteht aus einem Elektrodenkörper mit auswechselbarer Kanüle. Die Kanüle wurde aus einer Luer-Lock-Kanüle mit einem inneren Durchmesser von 0,8 mm hergestellt. Nach dem Kürzen auf 30 mm wurde die Spitze elektrolytisch angeschärft, um ein leichteres Eindringen in das Hirngewebe zu ermöglichen.

Zum Schärfen der Kanüle wurde ein Ätzbad, bestehend aus 40 % konzentrierter Schwefelsäure und 60 % konzentrierter Phosphorsäure, angesetzt. Die Kanüle wurde in das Bad eingetaucht und über eine stufenlos regulierbare Gleichstromquelle, bei der die Kanüle als Anode, ein Silberdraht als Kathode geschaltet waren, mit 20 V und maximal 2 A, abgeätzt. Nach dem Reinigen in destilliertem Wasser wurde die Außenfläche der Kanüle mit Silicon (Fa. Pierce Eurochem) isoliert. Zur besseren Haltbarkeit wurde die Siliconschicht im Trockenschrank bei 100° C eingebrannt.

Der Elektrodenkörper besteht aus einem Messingrohr, das elektrolytisch vergoldet wurde, mit Luerlockansatzstücken für die Kanüle und für den seitlichen Anschluß einer gasdichten Präzisionsspritze. Die Präzisionsspritze wurde über einen Teflonschlauch zur Erzeugung von Unterdruck zur Gewebsentnahme an den Elektrodenkörper angeschlossen. Oben wurde das Rohr verschlossen und mit einer Buchse zum Anschluß an den Vorverstärker versehen (siehe 3. Registriertechnik). Der Elektrodenkörper wurde mit Teflon isoliert und in den Halter eines Mikromanipulators (Leitz) eingesetzt.

Das hydraulische System (Kanüle - Elektrodenkörper - Spritze) wurde mit McCoy-5a-Medium (McCOY et al., 1959) gefüllt. Durch Anwendung eines Unterdruckes schon beim Einfahren der Elektrode war gewährleistet, daß der ausgestanzte Gewebszylinder nicht gequetscht wurde. Durch Verstärkung des Unterdruckes konnte funktionell identifiziertes Gewebe entnommen werden. Die neuronale Aktivität wurde über die Kanüleninnenwand abgeleitet, dies war jedoch nur dann möglich, wenn der Gewebepfropf die Kanülenspitze verschloß.

Als Gegenelektrode wurde bei Ableitungen in situ eine in der Nähe der Ableitstelle angebrachte "Klemme", bei extracorporaler Ableitung eine Ag-AgCl-Elektrode in der Ableitschale aus Polystyrol verwendet.

3. Registriertechnik

Die 10 µ Platin-Quarz-Elektroden wurden über den Elektrodenhalter, die Extraktionselektrode direkt mit einem verlustarmen Koaxialkabel über einen Vorverstärker (10^{11} Ω Eingangskapazität, kompensierbar) an den Kathodenstrahloscillographen (Fa. Tektronix, Dual Beam Typ 565, Verstärkereinschub 3A9) angeschlossen. Die im Kathodenstrahloscillographen (KO) weiterverstärkten und gefilterten Signale (Frequenzfilter mit 3 dB Dämpfung/Dekade, obere Grenzfrequenz 30 kHz, untere Grenzfrequenz 100 Hz) wurden über den KO-Ausgang parallel weitergeleitet: 1. Über einen Audioverstärker auf einen Lautsprecher zur akustischen Darstellung, 2. auf ein Magnetbandgerät (Akai Typ 280 D-SS) zur Speicherung, 3. auf einen Mehrkanalschreiber (Schwarzer, Typ Varioscript V 822), wobei mit Hilfe spezieller Einschübe (AF 790) Spikefrequenz und Normspikes fortlaufend geschrieben wurden (KOEPCHEN, HEINICH, 1964).

Zur Auswertung der auf Magnetband gespeicherten Signalfolgen der extracorpo-

ralen Ableitungen und zur Einzelspikeanalyse wurde ein Zweikanal-Speicher-Kathodenstrahloscillgraph (Speicher-KO, Firma Tektronix, Typ 5103 N) eingesetzt. Die zeitliche Ablenkung konnte zwischen 0,1 ms - 5 s/division variiert werden. Damit war es möglich, bis zu 50 s dauernde Abschnitte der Spikeregistrierung sichtbar zu machen. Bei der Spike-Identifizierung wurde das den eingestellten Schwellenwert übersteigende Signal über ein Verzögerungsgerät (Konstruktion des Elektroniklabors, Physiologisches Institut der FU Berlin), mit verstellbaren Verzögerungseinheiten, geleitet. Damit wurde der Spikeverlauf in ganzer Länge auf dem Bildschirm sichtbar gemacht. Hintereinanderfolgende Signale konnten auf diese Weise übereinanderprojiziert und voneinander abweichende Verlaufsformen festgestellt werden. Die in der zeitlichen Ablenkung von 0,2 ms/division dargestellten Spikes wurden um 0,8 ms verzögert. Zur Dokumentation wurden die sichtbar gemachten Signale vom Speicher-KO mit einer Kleinbildkamera fotografiert.

Die abgeleiteten neuronalen Aktivitäten waren häufig durch eine ungünstige Signal-Rausch-Relation schwer darstellbar. Um die Darstellung zu verbessern, wurde eine Rauschsperre (Konstruktion: Physiologisches Institut der FU Berlin) entwickelt, die es ermöglicht, ein Überstrahlen dieser Spikes durch die Helligkeit der Hintergrundaktivität beim Fotografieren zu vermeiden.

Die auf Magnetband gespeicherten Signale wurden in einigen Fällen mit der Kymograph-Kamera (Fa. Grass Instruments) vom Kathodenstrahloscillographen mit einem Filmvorschub von 25 mm/s gefilmt, um neuronale Aktivitäten über längere Zeiten ununterbrochen darstellen zu können.

Registrierung der Atmung

Die Registrierung der Atmung konnte nicht, wie bei adulten Tieren, über ein Ventil, bei dem In- und Exspirationsluft getrennt werden, durchgeführt werden, da trotz der geringen Ventilgröße eine weit über das physiologische Maß hinausgehende Totraumbelastung die Folge wäre. Deshalb erfolgte die Registrierung der Atmung über einen NTC-Widerstand (negativer Temperaturkoeffizient), der auf die Temperaturunterschiede zwischen der Ein- und Ausatmungsluft im Trachealraum anspricht. Die in einem Temperaturmeßgerät (Fa. Knauer) verstärkten Signale wurden direkt auf den Schreiber und parallel dazu über die PCM-Technik (pulse code modulation, Fa. Johne & Reilhofer) auf ein Tonbandgerät weitergeleitet.

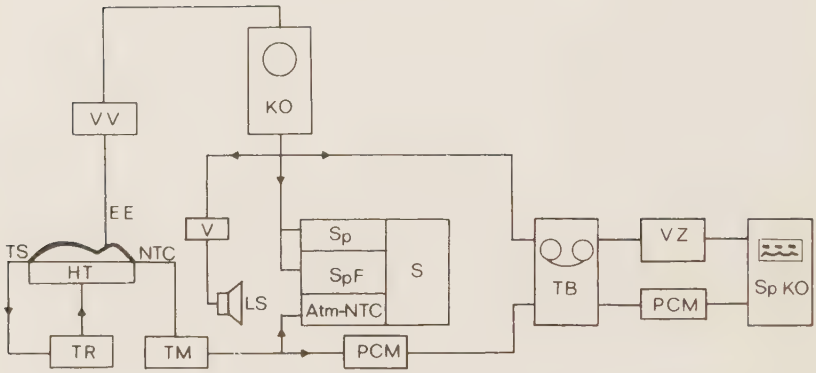

Abb. 1. Registrierschema.

Atm.NTC: Schreiberaufzeichnung der Atmung
EE : Extraktions-10 µ Platin-Quarz-Elektrode
HT : beheizbarer Operationstisch
KO : Kathodenstrahloscillograph
LS : Lautsprecher
NTC : Thermistor (Widerstand mit negativem Temperaturkoeffizienten)
PCM : Pulse code modulator
S : Mehrkanalschreiber
Sp : Schreiberaufzeichnung der Spikes
SpF : Schreiberaufzeichnung der Spikefrequenz
SpKO : 2-Kanal-Speicher-Kathodenstrahloscillograph
TB : Tonband
TM : Temperaturmeßgerät
TR : Temperaturregler
TS : Thermosonde
V : Verstärker
VV : Vorverstärker
VZ : Verzögerungsgerät

4. Versuchsablauf

Vorbedingung für die Durchführung der Experimente war die Kenntnis der respiratorischen Areale der Ratte. Untersuchungen der bulbären neuronalen Aktivität (KRUSCHE, 1977; SCHOTT et al., 1972) mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden an neugeborenen und adulten Ratten lagen vor. Auf diesen Erfahrungen und Lokalisationen aufbauend, wurde in grober Rasterdichte (0,3 mm) bei 40 Tieren der verwendeten Altersgruppe eine Lokalisation respiratorischer Areale durchgeführt, die eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KRUSCHE ergaben (Abb. 2).

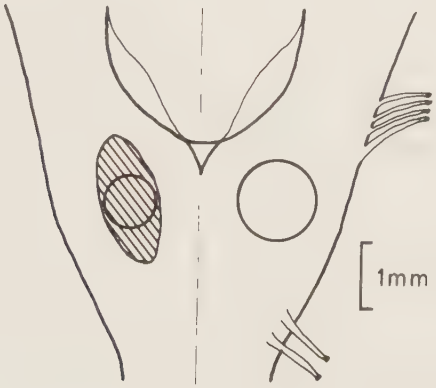

Abb. 2. Dorsalansicht der Medulla oblongata einer 13 Tage alten Ratte (Gewicht 26 g). Das schraffierte Gebiet auf der linken Seite stellt das in den Vorversuchen mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden abgesicherte respiratorische Prädilektionsgebiet dar. Der kleine Kreis im schraffierten Gebiet gibt den Durchmesser der Entnahmekanüle an. Der große Kreis rechts gibt schematisch das Gebiet wieder, in dem das Gewebe nach der Ableitung mit der Extraktionselektrode entnommen wurde.

Um auszuschließen, daß nicht am Rand des Atemzentrums abgeleitet wurde, wurden weitere Ableitungen mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden im Umkreis von 0,25 bis 0,40 mm durchgeführt. Gelangen drei bis vier weitere Ableitungen in die-

sem Umkreis, wurden keine weiteren durchgeführt, da nicht selten beim Ableiten selbst Neurone zerstört wurden.

Im so verifizierten Prädilektionsgebiet atemrhythmischer Neurone wurde unter Einhaltung der am Mikromanipulator gemessenen Koordinaten die Extraktionselektrode eingefahren. Dabei konnte man davon ausgehen, daß aufgrund des Durchmessers der Entnahmekanüle der vorher abgeleitete Bereich voll erfaßt wurde. Um sicherzugehen, daß der gesamte abgeleitete respiratorische Bereich sich in der Entnahmekanüle befindet und um eventuelle Schädigungen durch das Zerreißen neuronal aktiven Gewebes zu vermeiden, wurde mit der Extraktionselektrode 0,5 mm über den mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden ermittelten Aktivitätsbereich hinaus in das Gewebe eingefahren, d.h. bis zu einer Tiefe von ca. 1,8 mm. Unter Verstärkung des Unterdruckes und bei gleichzeitigem Hochfahren der Elektrode konnte Hirngewebe im abgeleiteten Areal entnommen werden. Das entnommene Gewebe wurde anschließend innerhalb von wenigen Sekunden in eine mit McCoy-5a-Medium (McCOY et al., 1959) gefüllte Ableitschale überführt und extracorporal abgeleitet.

Die Temperatur des Mediums in der Ableitschale wurde indirekt über den Heiztisch auf 36-37^{o} C konstantgehalten. Folgende Substanzen zur Beeinflussung der Aktivität wurden in die Ableitschale appliziert: 1. Strychnin; 2. Acetylcholin; 3. L-Noradrenalin; 4. Pentamethylentetrazol.

Der Funktionsablauf der Entnahme und die Ableitung wird in Abb. 3 dargestellt.

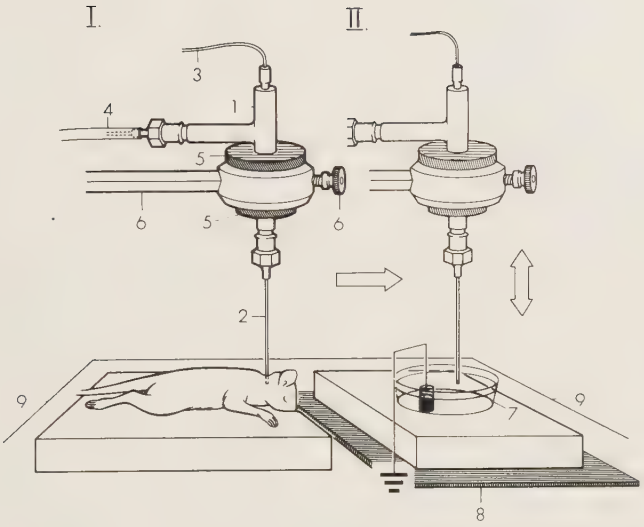

Abb. 3. Schematische Darstellung der kombinierten Ableitung und Entnahme.

Bei I wird das Einfahren mit der Extraktionselektrode mit Entnahme, bei II die extracorporale Ableitung in einer mit Medium gefüllten Ableitschale dargestellt.

1. Elektrodenkörper
2. Entnahme- und Ableitkanüle
3. Koaxialkabel zum Vorverstärker
4. Anschluß für die gasdichte Präzisionsspritze zur Erzeugung von Unterdruck
5. Isolation des Elektrodenkörpers
6. Halterung am Mikromanipulator
7. Ableitschale mit Ag-AgCl-Gegenelektrode
8. Isolation zwischen Heiztisch und Ableitschale
9. Heiztisch

D. ERGEBNISSE

1. Stereotaktische Lokalisation respiratorischer Aktivitäten mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden

Die vor jeder Entnahme durchgeführten Ableitungen mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden machten eine genaue stereotaktische Lokalisation des zu entnehmenden atemrhythmischen Substrates möglich. Die dabei und in 40 Vorversuchen gefundenen stereotaktischen Angaben deckten sich mit den Befunden von KRUSCHE (1977). Es konnte ebenfalls eine eindeutige lokale Häufung von inspiratorischen Neuronen in einer Tiefe von 0,7 bis 1,3 mm unter der dorsalen Oberfläche der Medulla oblongata in einem Gebiet, das sich 0,60 mm bis 1,65 mm lateral der Mittellinie von 1,25 mm caudal bis 0,60 mm rostral des Obex erstreckte, gefunden werden (Abb. 2). Ausgehend von den Untersuchungen von KRUSCHE (1977), ergab sich weiterhin, daß man sich mit größter Wahrscheinlichkeit im ventralen (BATSEL, 1967; MERRILL, 1970) und nicht im dorsalen Kerngebiet befindet (BAUMGARTEN et al., 1957; BAUMGARTEN et al., 1960; BIANCHI, 1971).

Exspiratorische Aktivitäten wurden in dem obengenannten stereotaktisch lokalisierten inspiratorischen Prädilektionsgebiet nur sehr vereinzelt gefunden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen an adulten Tieren von KRUSCHE (1977), der exspiratorischen Aktivitäten in einem verhältnismäßig kleinen Gebiet mehr lateral von der inspiratorischen Population und in größerer Tiefe lokalisierte.

Das Verhältnis der von uns abgeleiteten inspiratorischen zu exspiratorischen Aktivitäten lag bei 15:1 (vgl. auch KRUSCHE, 1977, der an adulten Tieren ein Verhältnis von ventralen und dorsalen inspiratorischen Aktivitäten zu exspiratorischen Aktivitäten von 3:1 fand, bei neugeborenen Tieren jedoch nur inspiratorische Aktivitäten ableiten konnte).

2. Ableitungen respiratorischer Aktivitäten mit der Extraktionselektrode vor und während der Entnahme

Nachdem aufgrund mehrerer positiv verlaufener Ableitungen mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden inspiratorische Aktivitäten stereotaktisch lokalisiert waren, wurde unter Einhaltung der am Mikromanipulator ermittelten Koordinaten mit der Extraktionselektrode eingefahren.

Beim Eindringen der Extraktionselektrode und gleichzeitigem Ansaugen des Gewebes konnte ein atemrhythmisches Rauschen akustisch wahrgenommen werden, das beim weiteren Einfahren zunehmend kräftiger und deutlicher wurde. Die z.T. unkoordinierten Aktivitäten auf dem Kathodenstrahloscillographen-Schirm erschienen rhythmischer und deutlich vom Grundrausch abgesetzt. In einer Tiefe, die nur unwesentlich von der mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden ermittelten maximalen Aktivität abwich (maximal 0,10 mm, bedingt durch den höheren Anpreßdruck), konnten dem Atemrhythmus streng zugeordnete Aktivitäten abgeleitet werden und blieben auch beim Tieferfahren der Extraktionselektrode erhalten. Erst nach verstärktem Ansaugen des Gewebes und gleichzeitigem Hochfahren der Elektrode wurde diese strenge Zuordnung teilweise durch eine starke Aktivitätszunahme verwischt, die sich aber oft wieder einstellte, sobald das Ansaugen des Gewebes und das Höherfahren mit der Elektrode unterbrochen wurde. Erst nach dem Abreißen des Gewebszylinders vom darunterliegenden Gewebe kam es zu unkoordinierten Aktivitäten (mit zahlreichen Verletzungspotentialen). Den Verlauf der neuronalen Aktivitäten beim Einfahren in das Gewebe und während der Entnahme zeigt Abb. 4.

Die mit der Extraktionselektrode abgeleiteten neuronalen Aktivitäten waren in Dauer und Verlaufsform mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden-Ableitungen aus der Medulla oblongata in situ vergleichbar (vgl. auch KRUSCHE, 1977).

In der Mehrzahl waren die Potentialverläufe der neuronalen Aktivitäten negativ-positiv oder positiv-negativ. In einem Versuch war der Verlauf rein negativ.

Während der kurzen Zeit des Hinüberfahrens in die Ableitschale konnten keine neuronalen Aktivitäten abgeleitet werden, da die Bezugselektrode fehlte.

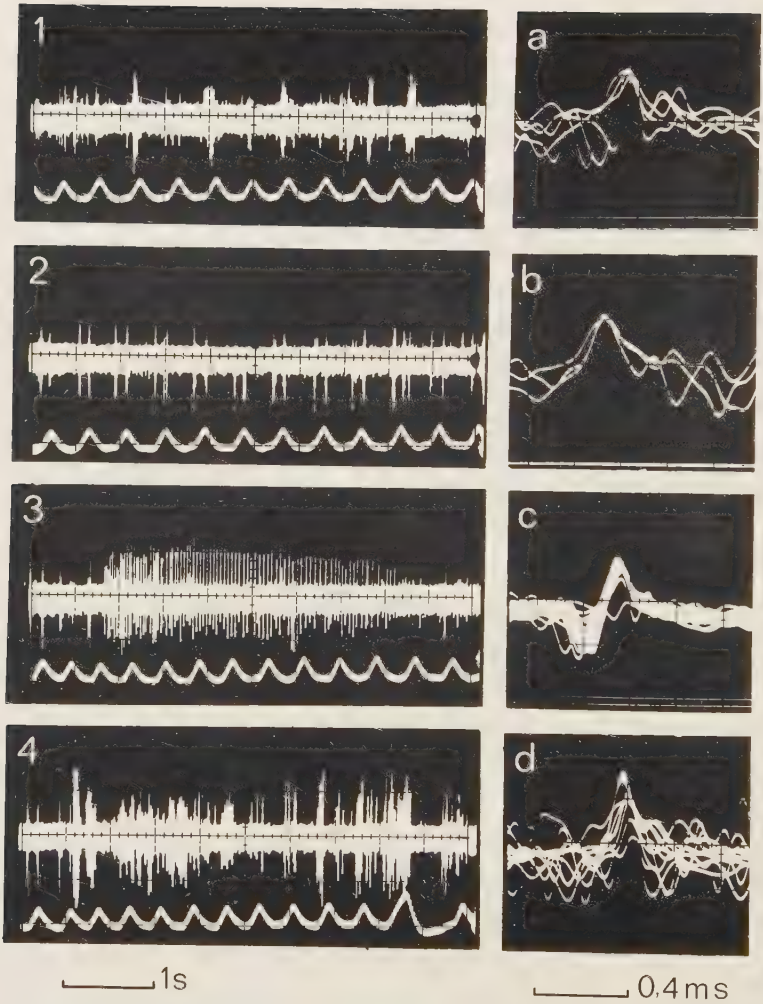

Abb. 4. Neuronale Aktivitäten während des Einfahrens in das Gewebe und bei der Entnahme. Legende siehe S. 29.

Abb. 4. Neuronale Aktivitäten während des Einfahrens in das Gewebe und bei der Entnahme. Die Bilder auf der linken Seite (1-4) zeigen Abschnitte der Entladungsmuster mit gleichzeitiger Atemregistrierung (Ausschlag nach oben: Einatmung) von 5 s (0,5 s/division) Dauer. Die Bilder auf der rechten Seite (a-d) zeigen die nach der beschriebenen Methode übereinanderprojizierten Einzelspikes (0,2 ms/division, Verzögerung 0,8 ms).

1. Bei Annäherung an das atemrhythmische Substrat. Erkennbar sind atemrhythmische Impulsgruppen mit anderen gemischt. a) zeigt, daß es sich um mehrere Neurone handelt.
2. Nach dem Eindringen der Kanülenspitze in das respiratorische Substrat erfolgt notwendigerweise durch die Kanüle eine teilweise Isolierung vom umliegenden Gewebe. Die Aktivität ist geringer geworden, aber strenger dem Atemrhythmus zugeordnet als vorher. b) zeigt, daß es sich um zwei unterschiedliche Neurone handelt, wobei zwei Spikes im Anstieg und Abfall deckungsgleich verlaufen.
3. Während des Ansaugens. Vorübergehende starke Aktivierung infolge des Ansaugvorganges, im wesentlichen auf die Aktivität eines Einzelneurons zurückzuführen (siehe c).
4. Nach weiterem Ansaugen ist der gesamte zu entnehmende Gewebszylinder in der Kanüle. Es ist zwar noch eine deutliche Zuordnung zum Atemrhythmus erkennbar, diese Zuordnung ist jedoch nicht mehr so streng wie in 2. Wie aus Abb. d) ersichtlich ist, handelt es sich um mehrere verschiedene Neurone, die zu dieser Aktivität beitragen.

3. Neuronale Aktivität in vitro

Es wurde in 98 Versuchen Gewebe aus dem atemrhythmischen Prädilektionsgebiet entnommen. Es handelte sich in allen Fällen um Entnahme von inspiratorischer Aktivität. Dies ist nicht in einer beabsichtigten Auswahl inspiratorischer Ableitungen begründet, sondern in der Tatsache, daß bei der jungen Ratte mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden eindeutig exspiratorische Aktivität nur selten beobachtet werden konnte (vgl. auch KRUSCHE, 1977).

Dabei waren in 22 Versuchen unregelmäßige oder kontinuierliche und in 8 Versuchen deutlich rhythmische Entladungsmuster zu sehen. Allgemein läßt sich sagen, daß die in vitro ableitbaren Aktivitäten dann besonders ausgeprägt waren, wenn auch in situ viel Aktivität gefunden wurde. Abb. 5 zeigt Beispiele verschiedener Entladungsmuster in vitro.

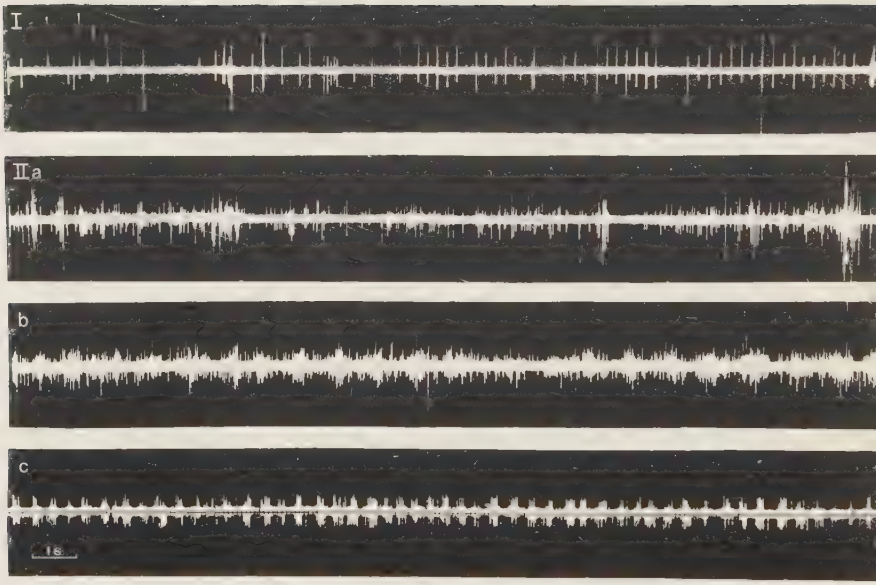

Abb. 5. Beispiele verschiedener Entladungsmuster in vitro.

I. Kontinuierlich erscheinende Aktivität mehrerer Einzelneurone.

II. a) Sehr unregelmäßig rhythmisch
b) Etwas mehr regelmäßig, mit Übergang zu multiplen rhythmischen Salven
c) Regelmäßige rhythmische Salven

II. a-c) geben die Entladungsmuster in einem Versuch wieder. Zwischen a) und b) wurde die Registrierung um ca. 25 s, zwischen b) und c) um ca. 15 s unterbrochen. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde elektronisch verbessert.

3.1 Rhythmische Entladungsmuster

Bei 8 Versuchen wurden deutlich erkennbare rhythmische Entladungsmuster unterschiedlicher Dauer gefunden. Die kürzesten rhythmischen Ableitungen konnten ca. 20 s, die längsten über 200 s abgeleitet werden.

Die rhythmische Aktivität setzte nach unterschiedlichen Zeiten in der Ableitschale ein. Es zeigte sich, daß den nur kurzfristig auftretenden Rhythmen eine bis zu mehrere Minuten dauernde unregelmäßige Aktivität vorausging, während bei den länger andauernden Rhythmen bereits nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale unregelmäßige Gruppierungen auftraten, die dann fließend in rhythmische Salven übergingen (Abb. 5, II. a)-c)).

Bei den 8 Versuchen (Abb. 6-13), wo deutlich rhythmische Entladungsmuster erkennbar waren, wurden die Periodendauern ausgemessen (Tab. 1-8). Dabei wurden 80 Periodendauern aus den 8 Versuchen gemittelt und der so errechnete Mittelwert zur Berechnung der Standardabweichung nach der Formel $s = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - x_n)^2}{n-1}}$ bei den Einzelversuchen zugrundegelegt.

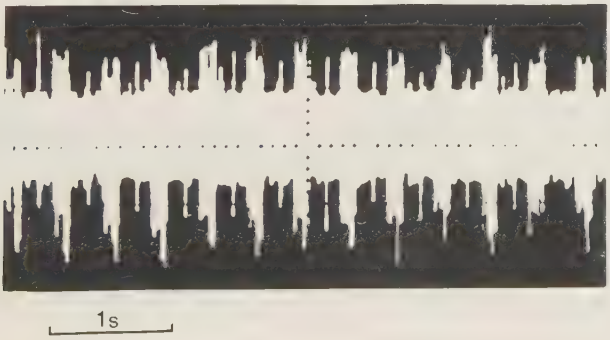

Abb. 6. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

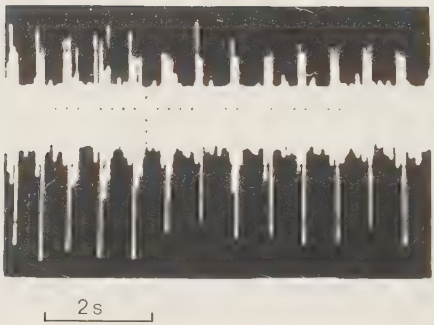

Abb. 7. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

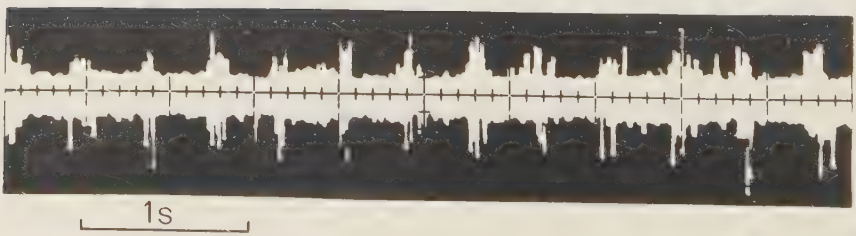

Abb. 8. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

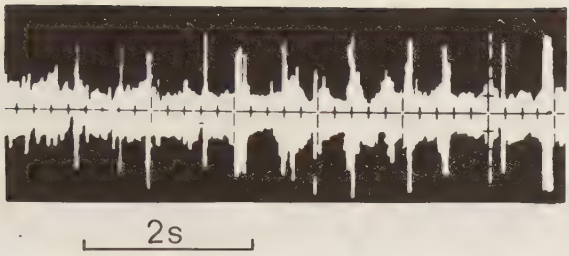

Abb. 9. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

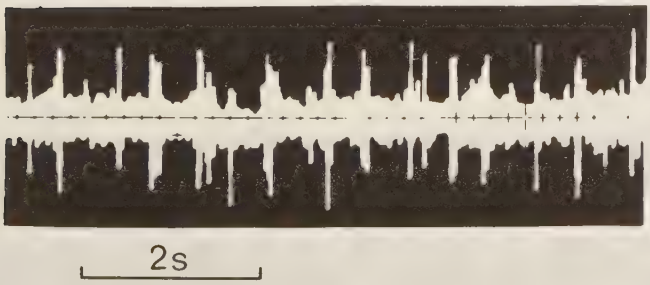

Abb. 10. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

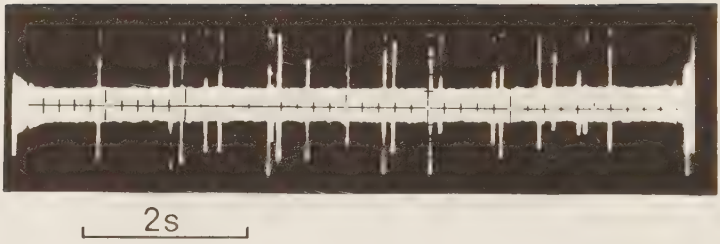

Abb. 11. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

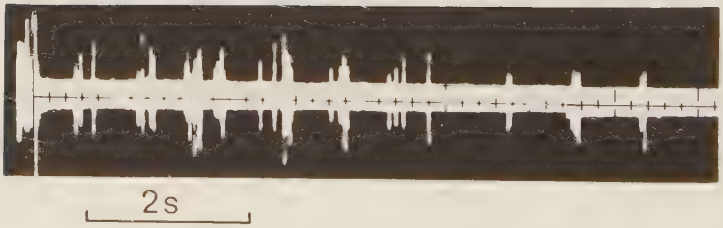

Abb. 12. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

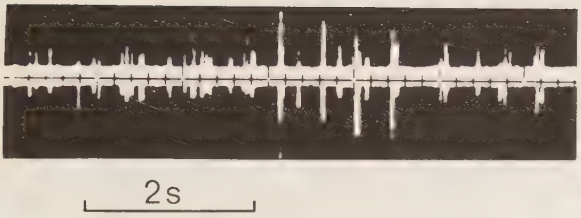

Abb. 13. Rhythmische Entladungsgruppen aus dem Gebiet respiratorischer Aktivität der Medulla oblongata in vitro. Signal-Rausch-Verhältnis elektronisch verbessert.

Tabelle 1 zu Abb. 6

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
18	0,38	-0,10	100
	0,42	-0,06	36
	0,38	-0,10	100
	0,38	-0,10	100
	0,40	-0,08	64
	0,38	-0,10	100
	0,38	-0,10	100
	0,40	-0,08	64
	0,38	-0,10	100
	0,38	-0,10	100

Tabelle 2 zu Abb. 7

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
17	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121
	0,59	+0,11	121

Tabelle 3 zu Abb. 8

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
18	0,42	-0,06	36
	0,39	-0,09	81
	0,39	-0,09	81
	0,39	-0,09	81
	0,32	-0,16	256
	0,40	-0,08	84
	0,25	-0,23	529
	0,43	-0,05	25
	0,40	-0,08	64
	0,25	-0,23	529

Tabelle 4 zu Abb. 9

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
16	0,53	+0,05	25
	0,31	-0,17	289
	0,43	-0,05	25
	0,53	+0,05	25
	0,47	-0,01	1
	0,47	-0,01	1
	0,47	-0,01	1
	0,37	-0,11	121
	0,47	-0,01	1
	0,51	+0,03	9

Tabelle 5 zu Abb. 10

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
20	0,27	-0,21	441
	0,32	-0,16	256
	0,34	-0,14	196
	0,32	-0,16	256
	0,40	-0,08	64
	0,34	-0,14	196
	0,44	-0,04	16
	0,57	+0,09	81
	0,52	+0,04	16
	0,47	-0,01	1

Tabelle 6 zu Abb. 11

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
20	0,40	-0,08	64
	0,76	+0,28	784
	0,45	-0,03	9
	0,49	+0,01	1
	0,42	-0,06	36
	0,56	+0,08	64
	0,73	+0,25	625
	0,52	+0,04	16
	0,45	-0,03	9
	0,36	-0,12	144

Tabelle 7 zu Abb. 12

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
18	0,74	+0,26	676
	0,54	+0,08	64
	0,35	-0,13	169
	0,52	+0,04	16
	0,83	+0,35	1225
	0,67	+0,19	381
	0,45	-0,03	9
	0,93	+0,45	2025
	0,77	+0,29	841
	0,77	+0,29	841

Tabelle 8 zu Abb. 13

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
19	0,44	-0,04	16
	0,52	+0,04	16
	0,44	-0,04	16
	0,24	-0,24	576
	0,30	-0,18	324
	0,49	+0,01	1
	0,36	-0,12	144
	0,58	+0,10	100
	0,49	+0,01	1
	0,80	+0,32	1024

Bei der Auswertung der 80 Perioden ergab sich die in Abb. 14 gezeichnete Häufigkeitsverteilung mit der größten Häufigkeit zwischen 0,4 und 0,5 s. Der Mittelwert der Periodendauer betrug 0,48 s mit einer Standardabweichung von ± 0,14, entsprechend einer Frequenz von 2,1/s oder 125/min.

3.1.1 Vergleich der rhythmischen Entladungsmuster mit den Periodendauern narkotisierter, operierter Tiere und wacher Tiere

Um die gefundene Periodizität mit dem Atemrhythmus der intakten Ratten der gleichen Altersgruppe zu vergleichen, wurden die Atemfrequenzen der narkotisierten und in der angegebenen Weise operierten Tiere vor der Entnahme gezählt. Die Zählung wurde anhand der Aufzeichnungen des Mehrkanalschreibers (Schwarzer) durchgeführt. 50 Versuche wurden ausgewertet. Die Atemfrequenz wurde über einen Zeitraum von 60 s, etwa 3-5 min vor dem Einfahren der Extraktionselektrode, ermittelt und in Periodendauern umgerechnet (Tabelle 9). Erwähnenswert ist, daß die Atemfrequenz der Tiere dieser Altersgruppe, gemessen an der Atemfrequenz adulter Tiere, fast doppelt so hoch ist.

Hierbei ergab sich ein Mittelwert von 0,59 s mit einer Standardabweichung von + 0,13 (siehe rechter Pfeil in Abb. 14). Außerdem wurde bei einer Gruppe von 15 nicht narkotisierten jungen Ratten aus vier verschiedenen Würfen im Alter von 8-17 Tagen die Atemfrequenz gezählt und ebenfalls in Periodendauern umgerechnet (Tabelle 10).

Tabelle 9 Narkotisierte Tiere

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,59	Δx^2
19	0,56	- 3	9
	0,74	+15	225
	0,56	- 3	9
	0,83	+24	576
20	0,59	0	0
24	0,83	+24	576
25	0,53	- 6	36
	0,53	- 6	36
	0,42	-17	289
	0,64	+ 5	25
	0,42	-17	289
	0,56	- 3	9
26	0,56	- 3	9
27	0,91	+32	1024
	0,67	+ 8	64
	0,71	+12	144
	0,83	+24	576
	0,59	0	0
	0,53	- 6	36
	0,42	-17	289
	0,38	-21	441
28	0,38	-21	441
	0,46	-13	169
29	0,44	-15	225
	0,56	- 3	9
	0,56	- 3	9
	0,56	- 3	9
30	0,53	- 6	36
	0,56	- 3	9
	0,44	-15	225
31	0,82	+23	529
32	0,67	+ 8	64
	0,56	- 3	9
	0,56	- 3	9
	0,48	-11	121
	0,63	+ 4	16
35	0,67	+ 8	64
	0,72	+13	169
	0,56	- 3	9
	0,83	+24	16
37	0,53	- 6	576
	0,67	+ 8	64
	0,63	+ 4	16
	0,77	+18	324
	0,71	+12	144
	0,56	- 3	9
	0,56	- 3	9
	0,52	- 7	49
	0,50	- 9	81
39	0,57	- 2	4

Tabelle 10

Wache Tiere

Gewicht (g)	Periodendauer (s)	Δx zu M.W. 0,48	Δx^2
32	0,46	-0,02	4
27	0,50	+0,02	4
25	0,55	+0,07	49
25	0,50	+0,02	4
30	0,50	+0,02	4
25	0,55	+0,07	49
29	0,50	+0,02	4
27	0,46	-0,02	4
29	0,40	-0,08	64
29	0,54	+0,06	36
27	0,46	-0,02	4
19	0,46	-0,02	4
20	0,42	-0,06	36
20	0,50	+0,02	4
23	0,46	-0,02	4

Dabei ergab sich eine gemittelte Periodendauer von 0,48 s mit der bemerkenswert geringen Streuung von ± 0,04 (siehe linker Pfeil in Abb. 14).

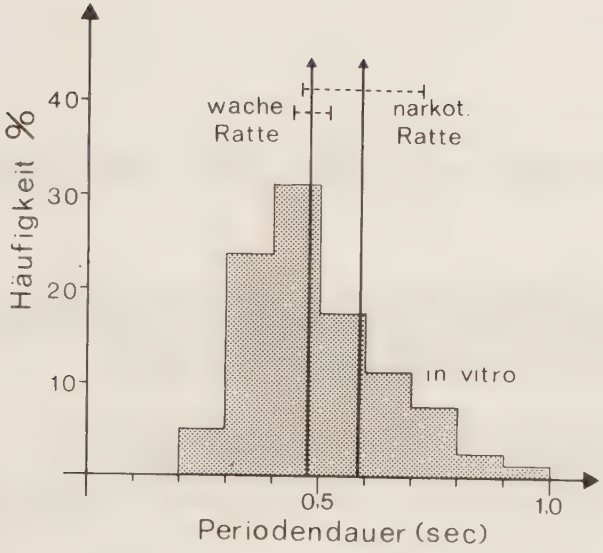

Abb. 14. Häufigkeitsverteilung der Periodendauern rhythmischer Entladungen in vitro im Vergleich zu den Periodendauern narkotisierter, operierter Tiere und wacher Tiere. Linker Pfeil: Größte Häufigkeit der Periodendauern von 15 spontan atmenden, intakten, wachen Ratten der gleichen Altersgruppe mit Standardabweichung. Rechter Pfeil: Größte Häufigkeit der Periodendauern von 50 narkotisierten und operierten Ratten vor der Entnahme medullären Gewebes mit Standardabweichung.

3.2 Rhythmen 2. Ordnung

Bei einigen der in der Größenordnung der Atemfrequenz liegenden Entladungsgruppen wurde gelegentlich eine intensivere Aktivität bei jeder 2. oder 3. Entladungsgruppe beobachtet, entsprechend einem Rhythmus 2. Ordnung mit der Hälfte oder einem Drittel der Hauptfrequenz (siehe auch Abb. 6), der an die bekannten ganzzahligen rhythmischen Koordinationen verschiedener Hirnstammrhythmen in situ erinnert (POLSTER, KOEPCHEN, 1962).

Abb. 15. Rhythmen 2. Ordnung. Rausch elektronisch unterdrückt, gefilmt mit 25 mm/s.

Auch nach Zugabe von Strychnin (0,10 ml ∿ 1,0 µg) blieb der Rhythmus 2. Ordnung weitgehend erhalten, wie aus Abb. 16 zu ersehen ist.

Abb. 16. Rhythmen 2. Ordnung nach Strychninapplikation. Nach Zugabe von Strychnin erfolgte eine starke Aktivitätssteigerung, wobei ein Rhythmus 2. Ordnung erhalten bleibt. Rausch elektronisch unterdrückt, gefilmt mit 25 mm/s.

3.3 Unregelmäßige Entladungsmuster

In 22 Versuchen wurden unregelmäßige oder kontinuierliche Entladungsmuster abgeleitet. Die unregelmäßig auftretenden Aktivitäten waren am häufigsten zu finden, nur von kurzer Dauer (maximal 30 s) und setzten meistens nach einer kurzen Latenzzeit (maximal 8 s) nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale ein (Abb. 17).

Abb. 17. Unregelmäßige Entladungsmuster in vitro. Nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale tritt nach ca. 7,5 s unregelmäßige Aktivität auf, die über 25 s weiterverfolgt werden konnte.

3.4 Kontinuierlich erscheinende Entladungsmuster

Neben den unregelmäßig auftretenden Entladungsmustern, die nur kurze Zeit ab-abgeleitet werden konnten, waren in drei Versuchen Übergänge von unregelmäßigen zu kontinuierlich erscheinenden Entladungsmustern gefunden worden. Bei diesen Versuchen zeigte das entnommene Gewebe, kurz nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale, besonders viel Aktivität. Die unregelmäßigen Entladungen

waren dabei bis zu maximal 25 s ableitbar und setzten dann spontan zu kontinuierlich erscheinenden Entladungsmustern um, die bis zu maximal 420 s abgeleitet wurden (Abb. 18). Auch nach Zugabe von Strychnin feuerten diese Nervenzellen noch bis zu 300 s weiter.

Diese angegebenen Zeiten lassen nicht den Schluß zu, daß nur über diese Zeiträume Ableitungen möglich wären, da es lediglich aufgrund von Manipulationen (mechanischer, elektrophysiologischer und pharmakologischer Art) zu einem Abbruch der Ableitungen kam.

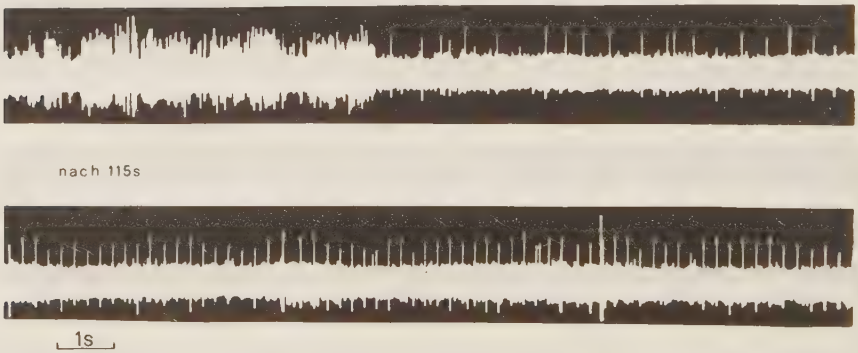

Abb. 18. Unregelmäßige Entladungsmuster mit Übergang zu kontinuierlich erscheinenden. Starke Aktivität kurz nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale mit anschließender spontaner Umsetzung zu kontinuierlich erscheinenden Entladungsmustern (Frequenzänderung!).

4. Artefaktausschluß

Bei 20 Entnahmen aus anderen Bereichen der Medulla oblongata konnten in drei Versuchen sehr kurz dauernde Aktivitäten, kurz nach dem Hinüberfahren in die Ableitschale, abgeleitet werden, die keine deutlich rhythmischen Gruppierungen aufwiesen.

Zum Ausschluß von elektrischen Artefakten wurden Testversuche durchgeführt. Etwa 100 Kontrollversuche wurden bei identischer Versuchsanordnung a) mit leerer Entnahmekanüle, b) mit Hirngewebe nach Entnahme an gleicher Stelle aus dem toten Tier, durchgeführt. Es konnten dabei in keinem Fall Aktivitäten in vitro abgeleitet werden.

4.1 Strychninapplikation

In den Experimenten mit deutlich in vitro ableitbarer Aktivität konnte durch Zugabe von Strychnin (CRAIN, 1952; CRAIN, 1972; CRAIN und BORNSTEIN, 1964; FREEMAN, 1973; CUNNINGHAM, 1961 b) eine Aktivitätszunahme hervorgerufen werden (Abb. 16 und 19), wobei kein Anstieg der Hintergrundaktivität zu verzeichnen war. Diese Aktivitätszunahme, sowohl in Amplitude als auch in der Frequenz, konnte bis zu 300 s beobachtet werden.

Zugaben von Acetylcholin, L-Noradrenalin und Pentamethylentetrazol zeigten keine Effekte. Diese Versuche sind nur als orientierend zu betrachten, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß bei anderen Dosierungen ebenfalls Effekte zu erzielen wären.

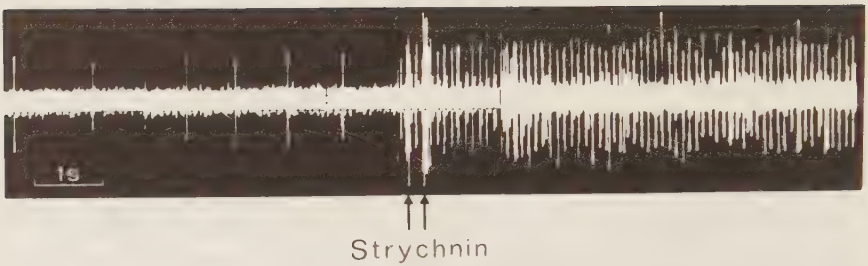

Abb. 19. Aktivitätszunahme nach Strychninapplikation. Nach Zugabe von Strychnin erfolgt eine starke Aktivitätszunahme sowohl in der Frequenz als auch in der Amplitude, wobei kein Anstieg der Hintergrundaktivität auftrat (Pfeile: Jeweils 0,5 µg Strychnin in 0,05 ml).

4.2 Artefaktidentifizierung am Speicher-KO

Mechanische Artefakte, die durch Erschütterungen, Manipulationen oder durch Zugabe von Substanzen in die Ableitschale hervorgerufen wurden, konnten mittels Spike-Identifizierung am Speicher-KO, aufgrund der längeren Dauer und der anderen Verlaufsform deutlich von neuronalen Aktivitäten unterschieden werden (Abb. 20 und 21).

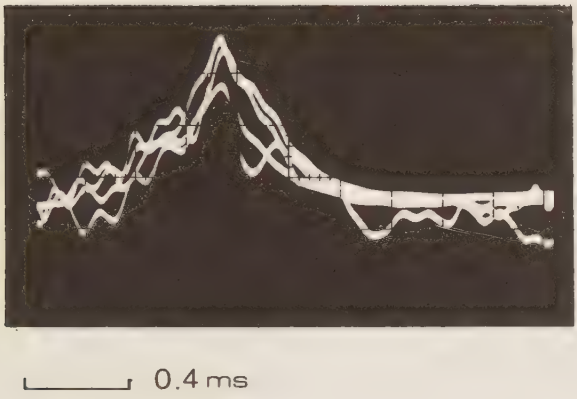

Abb. 20. Artefaktdarstellung am Speicher-KO. Artefakt, hervorgerufen durch mechanische Manipulation am Gewebszylinder. Vgl. hierzu Abb. 21.

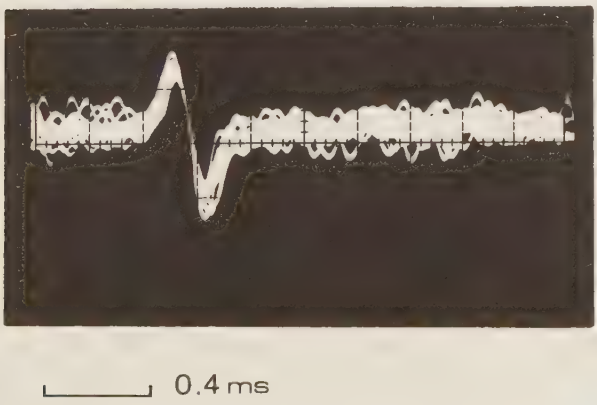

Abb. 21. Einzelspikedarstellung neuronaler Aktivität. Die neuronale Aktivität unterscheidet sich deutlich von den oben dargestellten Artefakten. Vgl. hierzu Abb. 4 c in situ.

E. GEWEBEKULTUR

Die vorher beschriebene Entnahmemethode ermöglichte es, funktionell identifiziertes Gewebe der Gewebekultur zur morphologischen und histologischen Untersuchung zuzuführen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode der Gewebekultur ("Sandwich-Methode") ist eine abgewandelte Art der Deckglasmethoden (siehe Überblick bei MURRAY, 1965). Sie bietet vor allem für morphologische Untersuchungen viele Vorteile: 1. Einfache und wenig aufwendige Handhabung, 2. gute mikroskopische Beobachtungsmöglichkeiten der auswachsenden Zellen und, damit verbunden, eine einfache Dokumentation, 3. einfache Fixier- und Färbetechniken.

1. Technik der Zellkultivation

Explantat

Zum Anlegen der Gewebekultur wurde das funktionell identifizierte Gewebe aus der Entnahmekanüle in die mit Medium gefüllte Ableitschale abgepreßt. Nach mehrmaligem Waschen mit sterilem Medium wurde der Gewebszylinder unter mikroskopischer Kontrolle (50-fach) mit einer feinen Schere (Iridektomieschere) in 3-5 scheibenförmige Teile zerschnitten und explantiert.

Kulturschale

Auf dem Boden einer sterilen Petrischale (Durchmesser 30 mm) aus Polystyrol (Fa. Kreiner) wurde ein Distanzglas (4 x 5 mm, Nr. 1) und ein Teilstück des entnommenen Gewebes, ca. 0,2 bis 0,3 mm^3, eingelegt und beides mit einem Deckglas (4 x 15 mm, Nr. 1) abgedeckt. Das Deckglas wurde durch punktuelles Auftropfen von heißem Paraffin am Boden der Petrischale fixiert.

Das Distanzglas verhinderte hierbei ein Quetschen des Gewebes, gewährleistete aber andererseits einen gewissen Anpreßdruck, der das Wegschwemmen des Explantates verhinderte.

Nach Zugabe des Nährmediums (2-3 ml) wurde die Petrischale mit Hilfe eines Speziallötkolbens luftdicht verschweißt und bei 37^{o} C inkubiert (Brutschrank, Fa. Memmert).

Medium

Dem Nährmedium McCoy 5a (McCOY et al., 1959) wurden 300 mg% Glucose (POMERAT und COSTERO, 1956), 20 % fetales Kalbserum (Fa. Flow) und als Antibiotikum 50 mg/l Bycomycin (Fa. Byk Gulden) zugesetzt. Das Medium wurde selbst hergestellt und mit Hilfe von Membranfiltern der Porengröße 0,22 µ (Fa. Millipore) sterilisiert. Osmolalitätsmessungen mit dem Halbmikroosmometer (Fa. Knauer & Co.) ergaben Werte von 330-360 mOsmol. Der pH-Wert des Mediums wurde durch Begasung mit CO_2 auf 7,2 pH eingestellt (Indikator: Phenolrot 10 mg/l).

Umsetzung

Im Abstand von 2-3 Tagen wurde das Medium in den Kulturschalen ausgetauscht. Dazu wurde in den Deckel der Petrischale mit Hilfe eines Lötkolbens eine kleine Öffnung geschmolzen, das Medium abgesaugt und frisches Medium zugesetzt. Die Öffnung wurde anschließend mit Polystyrol zugeschmolzen.

Mikroskopische Kontrolle

Die Kulturen wurden alle 2 Tage unter mikroskopischer Kontrolle beobachtet und auswachsende Zellen unter Phasenkontrast bei 156-facher bis 400-facher Vergrößerung identifiziert und fotografiert (Ultraphot II, Fa. Zeiss).

2. Histologische Verfahren

Fixierung der Gewebekulturen für Nissl-Färbung

Nach dem Absaugen des Mediums aus der Kulturschale wurden die Kulturen, beginnend mit 40 %igem Alkohol, innerhalb von 2 Stunden die Alkoholreihe hochgeführt. Nach 24-stündiger Fixierung in 96 %igem Alkohol wurde die Alkoholreihe rückwärts bis zum Wasser durchgezogen. Durch die schrittweise Entwässerung wurde einer eventuellen Zerstörung der Zellen entgegengewirkt.

Nissl-Färbung nach PISCHINGER (1968)

Die fixierten Kulturen wurden, da der Farbstoff aus der sauren Lösung nur langsam angenommen wurde, 50-60 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle mit folgender Farblösung gefärbt: 1,0 ml 1 N Essigsäure, 1,0 ml 1 N Natriumacetat, 0,064 g Metylenblau, destilliertes Wasser ad 100 ml (pH der Farblösung 4,65). Nach der Färbung wurde in der gleichen Pufferlösung ohne Farbstoff abgespült

und in 4 %iger Ammoniummolybdatlöstung fixiert.

Fixierung für die Neurofibrillendarstellung

Nach dem Absaugen des Mediums aus der Kulturschale wurden die Kulturen in einem Gemisch aus Formol (5 ml), Eisessig (5 ml) und 80 %igem Alkohol (90 ml) 24 Stunden fixiert.

Silberimprägnation nach BODIAN (1968)

Die fixierten Kulturen wurden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und 24 Stunden bei 37° C in einer 1 %igen Lösung aus Silberprotein (Chromagesellschaft, Stuttgart) imprägniert, mit Natriumsulfit reduziert und in Natriumthiosulfat fixiert.

Einbetten

Das Einbetten der gefärbten Kulturen war aufgrund der Trägersubstanz (Polystyrol) nicht auf die sonst übliche Art (Alkohol, Xylol, Balsam) möglich. Als geeignet für die Nissl-Färbung erwies sich ein Hochführen in der Alkoholreihe mit anschließender Einbettung in Immersionsöl der Firma Zeiss. Auch bei dieser wenig verbreiteten Art der Einbettung konnte kein Ausbleichen der gefärbten Kulturen festgestellt werden. Die nach BODIAN gefärbten Kulturen wurden nach dem sorgfältigen Waschen in destilliertem Wasser mit dem Einschlußmittel W 15 (Fa. Zeiss) für Objekte aus wässrigem Milieu direkt eingebettet.

Doppelfärbung der Kulturen

Die Kulturen wurden zur Färbung der Nissl-Schollen nach PISCHINGER aufgearbeitet. Zur Dokumentation wurden die Kulturen in der Pufferlösung fotografiert. Nach anschließender Wässerung in destilliertem Wasser wurden die Kulturen in das Einschlußmittel W 15 eingelegt. Über Nacht kam es zu einer vollständigen Entfärbung des Präparates. Nach mehrmaligem, sorgfältigem Waschen in destilliertem Wasser, bei dem das Einschlußmittel völlig entfernt wurde, konnten die Kulturen zur Darstellung der Neurofibrillen nach BODIAN umgefärbt werden.

3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 48 Gewebszylinder nach der extracorporalen Ableitung der Gewebekultur zugeführt, wobei bei allen aufgearbeiteten Gewebsentnahmen während des Einfahrens mit der Entnahmeelektrode und bei 30 auch in der Referenzschale Aktivitäten abgeleitet wurden. Aus den einzelnen Gewebszylindern gelang es maximal 5 scheibenförmige Explantate herzustellen, die dann einzeln in den Kulturschalen kultiviert wurden. Lediglich 30 % aller angesetzten Explantate zeigten nach einer Latenzzeit von 3-4 Tagen eine beginnende langsame Differenzierung.

3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Nach 3-4 Tagen erfolgte bei den erfolgreich verlaufenen Explantationen eine Abflachung an den Rändern des Explantates. Bei weiterer Differenzierung des Explantates war es möglich, einzelne Zelltypen aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie zu identifizieren.

Bei den ersten Zellen, die ringförmig auszuwandern begannen, handelte es sich um mesenchymatische Zellen (von Blutgefäßwandung und eventuell der Pia mater), die von Fragmenten zerstörter Zellen begleitet waren.

Die mesenchymatischen Zellen konnten in zwei Hauptgruppen unterteilt werden:

1. Fibroblasten, spindelförmige Zellen, deren lange Fortsätze radial orientiert waren. Ihre Kerne waren rund bis oval und in vielen Fällen enthielten sie mehrere Nucleoli.
2. Makrophagen, die sowohl in der Nähe als auch in der auswachsenden Zone des Explantates beobachtet werden konnten.

Nach 4-5 Tagen wanderte gliöses Gewebe aus, wobei es sich in der auswachsenden Zone hauptsächlich um Astrozyten und Oligodendrogliazellen handelte.

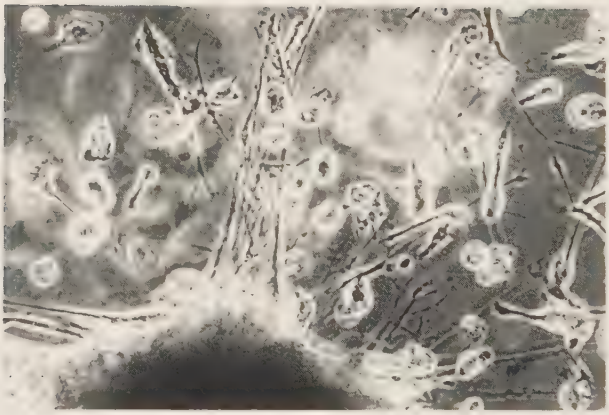

Abb. 22. Mesenchymatische Zelle. Beginnende Abflachung des Explantates mit auswachsenden mesenchymatischen Zellen. Vergrößerung 200-fach, Phasenkontrast, 5 Tage in vitro.

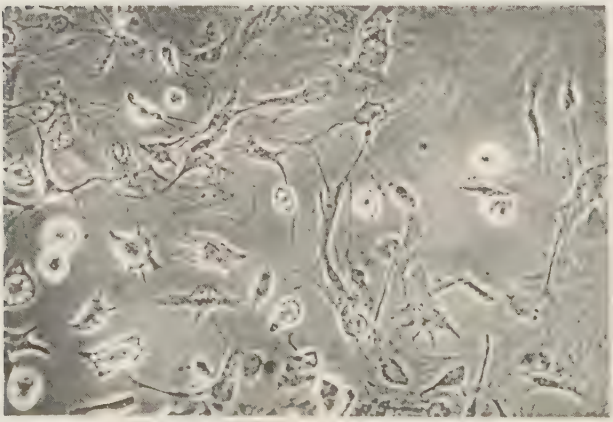

Abb. 23. Makrophagen unterschiedlicher Gestalt und Fibroblasten in der auswachsenden Zone des Explantates. Vergrößerung 200-fach, Phasenkontrast, 10 Tage in vitro.

Abb. 24. Fibroblasten (Ø ca. 20 µ x 35 µ). Spindelförmige Zellen in der auswachsenden Zone des Explantates mit z.T. paarigen Nucleoli. Vergrößerung 200-fach, Phasenkontrast, 3 Tage in vitro.

Die ersten auswandernden Astrozyten gehörten dem protoplasmatischen Typ an. Je weiter sie sich vom Mutterexplantat entfernten, desto großflächiger und verschwommener wurden die Zellumrisse. Die Astrozyten wiesen einen relativ runden, leicht erhabenen Nucleus auf, oftmals befanden sich im Kern zwei Nucleoli. In vielen Fällen konnten granulaartige Bestandteile im Zytoplasma beobachtet werden. Die Fortsätze der Astrozyten waren sternförmig und bildeten, vor allem in der Nähe des Explantates, Netzwerke. Bei zunehmendem Alter der Kultur wurden die protoplasmatischen Astrozyten seltener, dafür war der faserige Typ sehr oft vertreten.

Die Oligodendrogliazellen waren ebenfalls, wie die Astrozyten, relativ einfach zu identifizieren. Ihre Zellkörper waren bedeutend kleiner als die der Astrozyten. Das Cytoplasma war kompakt, im Phasenkontrast konnte man einen hellen Hof um ihre Zellkörper erkennen. Selten war ein Nucleus zu erkennen. Die kurzen und weniger zahlreichen Fortsätze entsprangen abrupt dem Zellkörper.

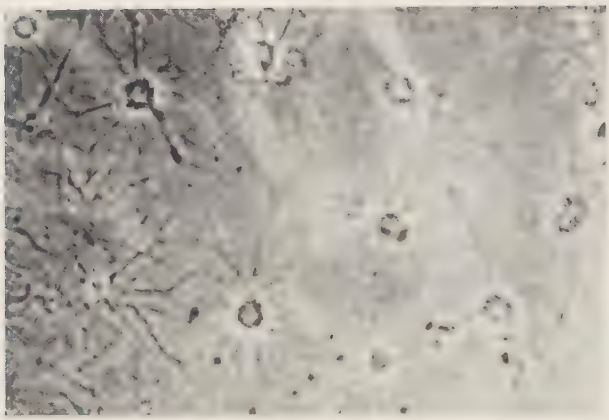

Abb. 25. Protoplasmatische Astrozyten (Ø ca. 15 µ) mit zahlreichen dicken und starken Fortsätzen. Vergrößerung 320-fach, Phasenkontrast, 10 Tage in vitro.

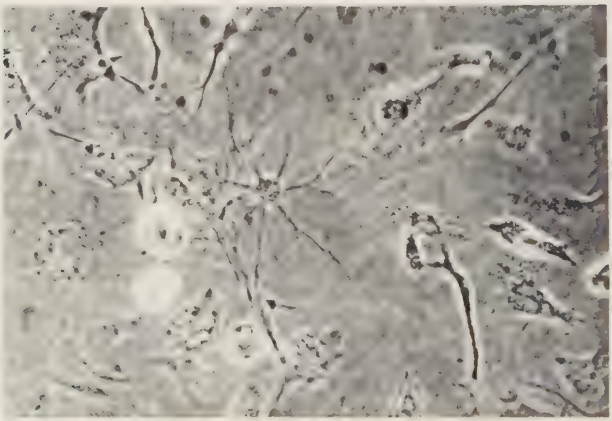

Abb. 26. Faseriger Astrozyt (Ø ca. 14 µ), mit dünnen und weniger zahlreichen Verzweigungen in der Nähe des Zellkörpers. Vergrößerung 320-fach, Phasenkontrast, 14 Tage in vitro.

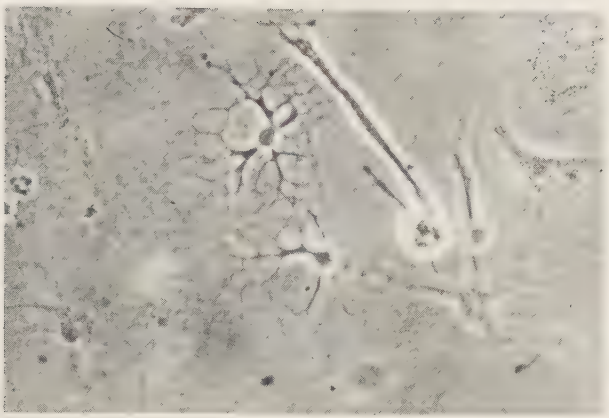

Abb. 27. Oligodendrogliazellen (Ø ca. 11 µ). Im Phasenkontrast ist der helle Lichthof um die Zellkörper erkennbar. Vergrößerung 320-fach, Phasenkontrast, 26 Tage in vitro.

Nach ca. 12-14 Tagen waren Teile des Explantates soweit differenziert, daß man im Phasenkontrast die ersten Neurone, eingebettet in gliöse Zellen, erkennen konnte. Die Identifizierung als Nervenzelle konnte lichtmikroskopisch allerdings nur aufgrund der bekannten morphologischen Kriterien wahrscheinlich gemacht werden: Die großen Zellkörper wiesen einen runden oder ovalen, erhabenen und meistens exzentrisch gelegenen Nucleus auf. Die Dendriten entspringen dem Pericarion mit breiter Basis, verzweigen sich meist rechtwinkelig bereits in geringer Entfernung vom Zelleib und sie weisen z.T. an ihren Endungen knospenartige Verdickungen auf. Das Axon ist wesentlich dünner als die Dendriten, entspringt abrupt dem Zellkörper und verläuft über eine lange Distanz unverzweigt mit fast konstantem Durchmesser.

Kulturen, die zahlreiche, nach morphologischen Gesichtspunkten erkennbare Neurone enthielten, wurden zur weiteren Identifizierung histologisch aufgearbeitet.

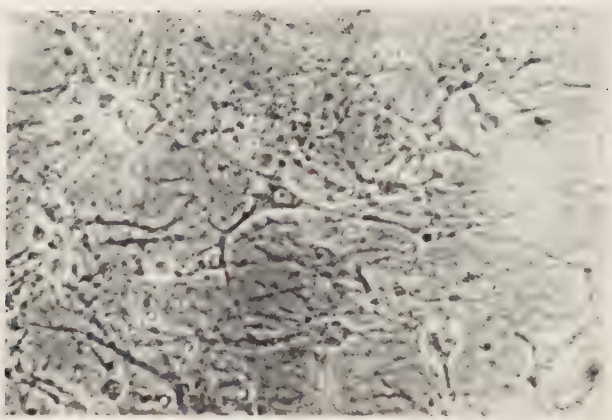

Abb. 28. Nervenzelle (Ø ca. 31 µ), eingebettet in gliöses Gewebe. Die Fortsätze sind z.T. von mesenchymatischen und Gliazellen überwachsen. Nach LUMSDEN (1968) typisches Neuron in der Medulla oblongata. Gut erkennbar der exzentrisch gelegene Nucleus. Das Axon liegt außerhalb der Focussierung. Vergrößerung 320-fach, Phasenkontrast, 19 Tage in vitro.

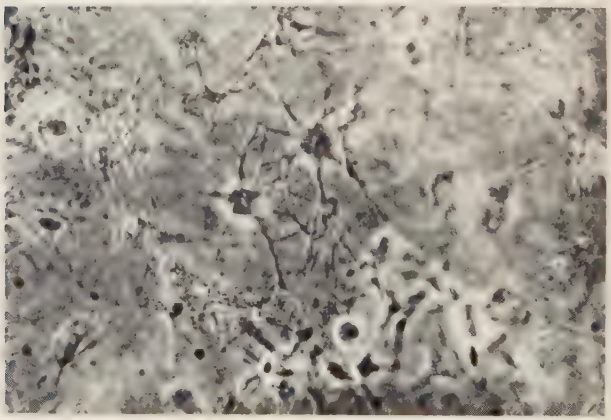

Abb. 29. Multipolare Nervenzelle (Ø ca. 22 µ). In den Kulturen der am häufigsten zu findende Neuronentyp. Vergrößerung 320-fach, Phasenkontrast, 28 Tage in vitro.

3.2 Histologische Färbungen

Die Nervenzellen weisen nicht nur gestaltliche, sondern auch strukturelle Besonderheiten auf, die sie von anderen Zellelementen eindeutig unterscheiden. Zum Beispiel im Strukturbild des Zelleibes, in dem sich mit verschiedenen Methoden schollige oder körnige und fädige Bildungen, die Nissl-Schollen und Neurofibrillen, nachweisen lassen.

3.2.1 Nissl-Färbung nach PISCHINGER (1968)

Nissl-Schollen können an der fixierten Nervenzelle durch Färbung mit basischen Farbstoffen, besonders mit Toluidinblau, dargestellt werden. Dabei färben sich die Nissl-Schollen bis in die Dendriten hinein an, lassen aber stets die Abgangsstelle des Neuriten (Ursprungskegel) frei (Abb. 30).

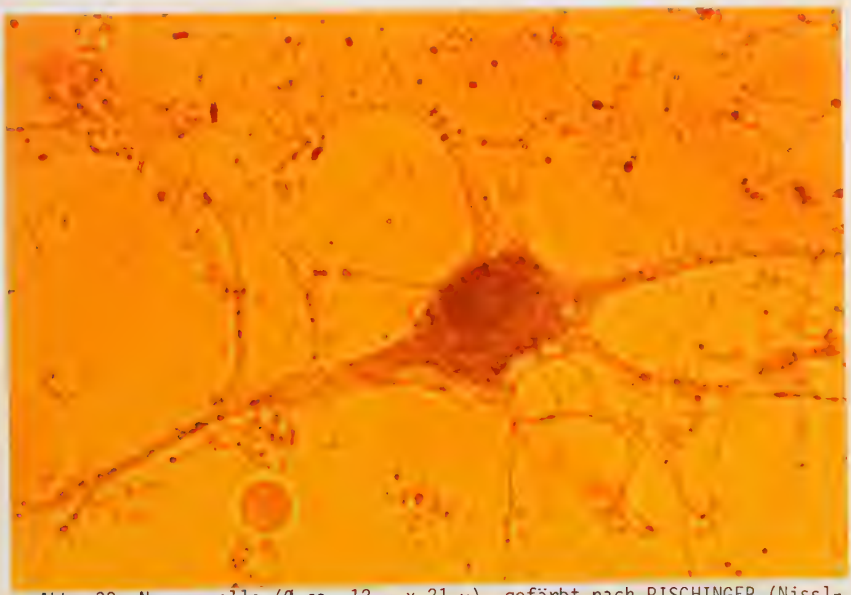

Abb. 30. Nervenzelle (Ø ca. 12 µ x 21 µ), gefärbt nach PISCHINGER (Nissl-Färbung). Die Nissl-Schollenausbildung ist bis in die Dendriten hinein gut erkennbar. Der exzentrisch gelegene Kern wird durch Nissl-Schollen überlagert. Der Ursprungskegel konnte aufgrund der geringen Tiefenschärfe nicht dargestellt werden. Vergrößerung 1440-fach, Ölimmersion, 17 Tage in vitro.

3.2.2 Neurofibrillendarstellung nach BODIAN (1968)

Bei Anwendung von Silberimprägnationsmethoden treten die Neurofibrillen bei starker Vergrößerung als feine Fäden im Zelleib und den Fortsätzen der Nervenzelle hervor. Die Parallelanordnung der Neurofibrillen ist dann besonders deutlich im Axon und den Dendriten aufgrund ihrer dunklen Färbung zu erkennen. Als besonders gut zur Darstellung von Neurofibrillen hat sich die Silberimprägnationsmethode nach BODIAN erwiesen.

Mit der Silberimprägnation nach BODIAN war es möglich, die unterschiedlichsten Neuronentypen zu erkennen und den ausgedehnten Verlauf des neuronalen Netzwerkes darzustellen. Die Abbildungen 31, 32, 33 und 34 veranschaulichen die vielfältige Gestalt der Neurone.

Abb. 31. Multipolare Nervenzelle mit zahlreichen Fortsätzen (Ø ca. 12 µ x 14 µ), gefärbt nach BODIAN. Der Axonverlauf ist nicht in der ganzen Länge sichtbar, da er außerhalb der Focussierung verläuft. Vergrößerung 320-fach, 28 Tage in vitro. Hellfeld.

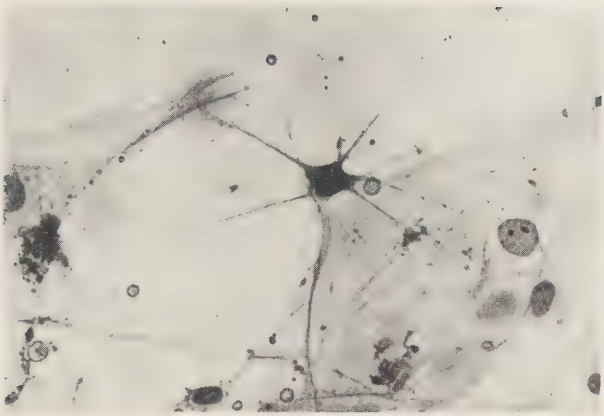

Abb. 32. Einzelneuron (Ø ca. 25 µ), gefärbt nach BODIAN. Gut erkennbar der exzentrisch gelegene Nucleus. Die Zelle ist eingebettet in gliöses Gewebe. Vergrößerung 320-fach, 26 Tage in vitro. Hellfeld.

Abb. 33. Nervenzelle mit zahlreichen Fortsätzen (Ø ca. 20 µ), gefärbt nach BODIAN. Vergrößerung 200-fach, 4 Wochen in vitro. Hellfeld.

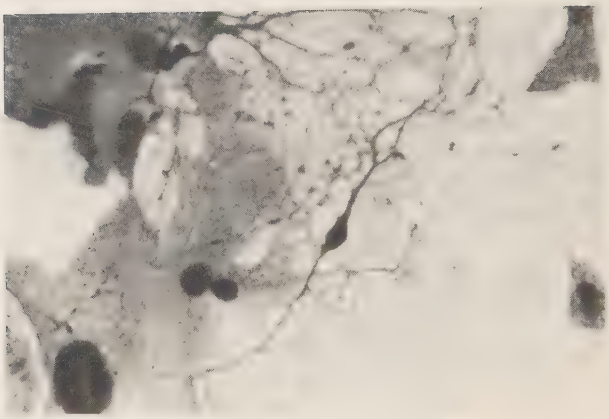

Abb. 34. Bipolare Nervenzelle (Ø ca. 12 µ x 31 µ), gefärbt nach BODIAN. Vergrößerung 320-fach, 26 Tage in vitro. Hellfeld.

3.2.3 Doppelfärbung nach PISCHINGER und BODIAN

Nissl-Schollen und Neurofibrillen konnten bisher nicht in ein und derselben Zelle befriedigend sichtbar gemacht werden. Ein gleichzeitiges Anfärben beider Bestandteile konnte ebenfalls nicht erreicht werden, jedoch wurde der Versuch unternommen, nacheinander beide Komponenten darzustellen. Die sogenannte "Doppelfärbung" führte zu guten und z.T. ausgezeichneten Resultaten (Abb. 35, 36 und 37).

Abb. 35. Nervenzelle (Ø ca. 22 µ), gefärbt nach PISCHINGER. Gut erkennbar die blaugefärbten Nissl-Schollen. Vergrößerung 575-fach, 17 Tage in vitro. Hellfeld.

Abb. 36. Nervenzellen (Ø ca. 22 µ), angefärbt nach PISCHINGER. Gut erkennbar die exzentrisch gelegenen Nuclei. Gleiche Kultur wie in Abb. 35. Vergrößerung 575-fach, 17 Tage in vitro. Hellfeld.

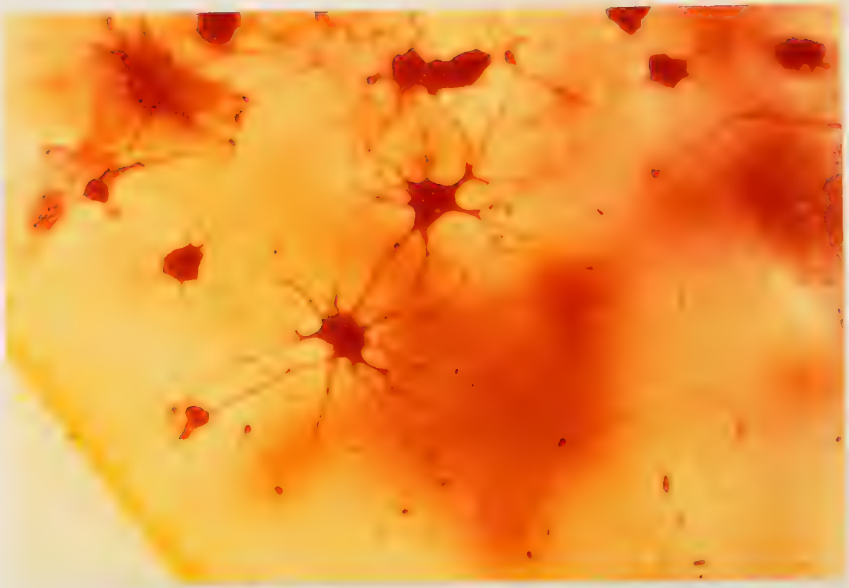

Abb. 37. Nervenzelle (Ø ca. 22 µ), umgefärbt nach BODIAN. Es wurden die gleichen Zellen wie in Abb. 35 und 36 dargestellt. Vergrößerung 320-fach. Hellfeld.

F. DISKUSSION

Die Methode der gleichzeitigen Ableitung und Entnahme von Nervengewebe ist völlig neu.

Da der ganze Innenmantel der Kanüle die Elektrode ist, ergibt sich, besonders bei einer allgemein hohen Aktivität des entnommenen Gewebes, die Schwierigkeit, bestimmte Einzel- oder auch Summenaktivitäten weniger Einheiten "herauszufiltern". Das führt zu den später zu besprechenden Schwierigkeiten der Ergebnisauswertung, was vor allem durch die oft geringe Signal-Rausch-Relation bedingt ist. Andererseits ist es möglich, eine größere Nervengewebsmenge abzuleiten und sich so ein Bild von der Summenaktivität zu machen.

Die Neuheit der Methode und die unumgänglichen mechanischen Manipulationen (bei der Entnahme, beim Obersetzen mit der Extraktionselektrode vom Tier in die Ableitschale und der Zugabe von Pharmaka in die Ableitschale), ebenso wie die möglichen altbekannten Störungen bei allen elektrophysiologischen Untersuchungen machten ausgiebige Kontrollversuche zum Ausschluß von Arte-

fakten erforderlich. Bei der Untersuchung, ob es sich bei den Signalen um Nervenaktivität oder um Artefakte handelt, stand die Auswertung mit dem Speicher-KO im Vordergrund. Die elektrischen Artefakte, die beim Obersetzen des Gewebes in die Ableitschale, bedingt durch die mechanische Erschütterung des Systems und Manipulationen in der Ableitschale und am Gewebszylinder auftraten, waren leicht und eindeutig von allen biologischen Aktivitäten sowohl durch die Dauer der Signale als auch durch die abweichende Verlaufsform zu unterscheiden, zumal sie nur sehr vereinzelt auftraten und niemals rhythmisch verliefen. Die bei den Kontrollversuchen unter identischen Bedingungen durchgeführten Entnahmen aus dem toten Tier (keine Ableitung des EKG's mehr) zeigten keinerlei Aktivität.

Ein weiterer eindeutiger Anhaltspunkt für die biologische Natur der Ergebnisse ergab sich aus der enormen Aktivitätszunahme nach Strychninapplikation (Abb. 16 und 19), wie es bei intakten Tieren von Zellen des ZNS (besonders der Zellkörper und Axone) bekannt ist (HEINBECKER und BARTLEY, 1939), womit ausgeschlossen werden kann, daß diese Aktivitäten auf Verletzungsentladungen geschädigter Zellen zurückzuführen sind. Das wird auch bei der Spikeidentifizierung am Speicher-KO deutlich (Abb. 21).

Ein Nachweis ganz anderer Art, daß das Gewebe nach der Entnahme mit der Extraktionselektrode grundsätzlich lebensfähig bleibt, erbringen die Ergebnisse der Nervengewebekultur mit den histologischen Untersuchungen (Färbungen). Ähnlich wie bei den extracorporalen Ableitungen liegt das Verhältnis der erfolgreich durchgeführten Explantationen bei 30 %. Dies ist wahrscheinlich auf die Verletzung der Nervenzellen während der Entnahme und bei der Präparation zurückzuführen, da dieser Eingriff so gravierend ist, daß wahrscheinlich die Mehrzahl der Neurone bereits degeneriert, bevor eine Migration der Zellen stattfindet. Es ist denkbar, daß Neurone aus diesem Gebiet überaus empfindlich sind, was mit Untersuchungen von OKAMOTO (1958) über Neurone der reticulären Formation übereinstimmen würde. Die nicht geschädigten Zellen paßten sich den Bedingungen der Kulturschale an. Nucleus und Nucleoli waren in den meisten Fällen exzentrisch gelagert. Im Zytoplasma konnten mit der Färbung nach PISCHINGER Nissl-Schollen nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Silberimprägnationsverfahrens zur Darstellung der Neurofibrillen konnte ebenfalls der Nachweis von Nervenzellen in der Kultur erbracht werden.

Mit dem Nachweis der Lebensfähigkeit ist eine Grundlage geschaffen worden, funktionell identifizierte Nervenzellen von Ratten der Altersstufe 8-17 Tage weiteren morphologischen, histologischen, pharmakologischen, biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen zuführen zu können.

Nach der durchgeführten Silberimprägnation nach BODIAN (1968) wiesen die identifizierten Neurone in der auswachsenden Zone des Explantates eine vielfältige Gestalt auf. Bi- und tripolare Neurone konnten relativ selten beobachtet werden, während multipolare Nervenzellen recht unterschiedlichen Aussehens zahlreicher zu finden waren. Die Silberimprägnation war in fast allen Fällen so stark, daß das Pericarion ein schwarzes, kompaktes Aussehen bekam und Einzelheiten, wie Kern und Nucleolus nicht mehr erkennbar waren.

Die bei LUMSDEN (1968) als in Form und Größe typisch abgebildeten Neurone der Medulla oblongata konnten selten beobachtet werden. Die Mehrzahl der gefundenen Neurone ließ sich eher mit den von RAMON-MOLINER (1968) im lateralen "reticulären" Nucleus der Medulla oblongata gefundenen Neuronen vergleichen. Ähnlichkeiten mit Neuronen des sensiblen Trigeminuskernes, ebenfalls beschrieben bei RAMON-MOLINER (1968), konnten festgestellt werden. Astrozyten und Oligodendrogliazellen wiesen keine gestaltlichen Besonderheiten auf. Sie sind vergleichbar in Größe und Aussehen mit den Befunden z.B. von HILD (1957), OKAMOTO (1958), MURRAY (1965), LUMSDEN (1968).

Es stellt sich die Frage, warum das Gewebe in der Referenzschale nur in ca. 30 % aller Entnahmen Aktivität zeigte. Dafür lassen sich u.a. folgende Gründe anführen: 1. Das Nervengewebe ist aus einem anästhesierten Tier entnommen, dessen ZNS sich in einem schon reduzierten Zustand befindet. 2. Die Durchtrennung von Nervengewebe mit der Wandung der Extraktionselektrode bedingt die Verletzung und Schädigung von einer großen Anzahl von Zellen. Darüber hinaus wird eine Vielzahl von interneuronalen Verbindungen zerstört. 3. Bei der Durchtrennung ist das Gewebe von der normalen Durchblutung und damit von der Sauerstoffzufuhr abgeschnitten, so daß die Sauerstoffzufuhr nur noch per diffusionem stattfindet. So gesehen stellen die 30 % positiven Ergebnisse sich nicht mehr als unerwartet gering dar.

Es stellt sich die Frage, durch welche Neuronenpopulation die Aktivität in

der Referenzschale bedingt ist. Zuerst wäre die Möglichkeit zu diskutieren, ob das Gewebe außerhalb (funktionell gesehen) des respiratorischen Bereiches für diese Spontanaktivität verantwortlich ist.

Bei der Entnahme von Nervengewebe von der dorsalen Oberfläche der Medulla oblongata befindet sich im Entnahmezylinder zwangsläufig auch Hirngewebe, das oberhalb des respiratorischen Prädilektionsgebietes liegt. Es stellt sich damit die Frage, ob die oberhalb dieses bzw. unterhalb dieses Gebietes liegenden Hirnanteile für die vorne beschriebenen Ergebnisse verantwortlich oder mitverantwortlich sein könnten. Dieses oberhalb des Gebietes liegende Gewebe besteht aus Nervenfasern und Nervenkernen (Nucleus burdach) und hauptsächlich dem sensiblen Nucleus sensorius nervi trigemini, hinzu kommt Material aus der Substantia reticularis.

Da dieses oberhalb des respiratorischen Areals liegende Nervengewebe auch in situ fast ausnahmslos nur nach Reizung Aktivitäten zeigt und nur selten spontan feuert (EISENMANN et al., 1963; KIRKPATRICK und KRUGER, 1975), kann man den Schluß ziehen, daß die registrierten Aktivitäten aus dem Gewebszylinder nur aus dem respiratorischen bzw. reticulären Gewebe kommen müssen.

Auch die Befunde in der Gewebekultur lassen zumindest auf den ersten Blick den Schluß zu, daß auch andere Teile der Medulla oblongata, als das respiratorische Areal zu einer Spontanrhythmik fähig sind (CORNER, CRAIN, 1972; CRAIN, 1972, 1973; CRAIN et al., 1968). Jedoch liegen bei diesen Autoren keine lokalisatorischen Bestimmungen über das explantierte medulläre Gewebe vor, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß respiratorische Anteile eine weitläufige Entladung im Explantat auslösen können. Dafür spricht auch der Befund bei CRAIN (1969), daß spontane Entladungen rhythmischer Art auch in Explantaten rein medullären Gewebes gefunden werden, jedoch nicht in anderen Teilen des ZNS.

Auffällig an den Ergebnissen, die von CORNER, CRAIN (1972) und CRAIN (1972, 1973) gefunden wurden, ist der Unterschied in der Frequenz zu den hier vorgelegten Befunden. Das mag vielleicht daran liegen, daß in der Gewebekultur, auch unter optimalen Bedingungen, strukturelle und funktionelle Ausfälle oder Abnormalitäten möglich sind, die aber bei der in dieser Arbeit entwik-

kelten Methode, aufgrund der kurzen Zeitspanne zwischen Entnahme und Ableitung (Sekunden), ausgeschlossen werden können. Ebenso führen Abtrennungen kleiner Teile des ZNS-Gewebes zu Veränderungen, zumindest in der neuronalen Erregbarkeit (CRAIN, 1969). Umso erstaunlicher ist es, daß CRAIN (1969) nicht nur langsamere Rhythmen fand, sondern auch Rhythmen in medullärem Gewebe (1-2 Entladungen/s) ableitete, die mit unseren Ergebnissen wenigstens teilweise übereinstimmen.

So gesehen, sprechen diese Befunde nicht dagegen, daß die abgeleiteten Rhythmen unter unseren Bedingungen respiratorischer Genese sein können, zumal wir auch aus den oben genannten Gründen (funktionell), als auch durch die vorhergehende Lokalisation mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgehen können, daß die Aktivität respiratorischem Nervengewebe entspringt. Obwohl ein gewisser Anteil exspiratorischer Neurone in diesem Nervengewebszylinder nicht ausgeschlossen werden kann (KRUSCHE, 1977), machen doch die eigenen Vorversuche mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden vor allem inspiratorische Neurone wahrscheinlich (das Verhältnis in- zu exspiratorischen Neuronen lag bei 15:1).

Auf der anderen Seite erinnert ein Teil der Ableitergebnisse (mehr oder minder unregelmäßige Entladungsmuster) eher an die Ergebnisse, die in vivo von reticulären Neuronen abgeleitet wurden, als an die Entladungsmuster respiratorischer Neurone (AMASSIAN, DEVITO, 1954; BAUMGARTEN, MOLLICA, 1954; SCHEIBEL et al., 1955; SEGUNDO et al., 1967). Aber sowohl der klassische Deafferentierungsversuch von SALMOIRAGHI und BURNS (1960 b), wobei die respiratorischen Neurone eine tonische Aktivität zeigten, als auch die Hyperventilationsversuche (BATSEL, 1967; COHEN, 1969; KOEPCHEN et al., 1970) zeigten, daß bei Verlust der Afferenzen die Rhythmizität abgeschwächt wird oder verloren geht und daß bei Wiederherstellung der normalen Zuflüsse bzw. bei der Arbeit von SALMOIRAGHI und BURNS (1960 b), durch kurzfristiges kontinuierliches Reizen der caudalen Schnittfläche, die "normale" Rhythmik wiedererlangt werden kann. Somit wird es auch erklärlich, daß in den eigenen Experimenten unregelmäßige Entladungen in rhythmische übergehen konnten (vgl. Abb. 5 IIa-c) oder nur unregelmäßige Aktivitäten zu finden waren (Abb. 17).

Bei den kontinuierlich erscheinenden Entladungsmustern ergaben sich die beiden Möglichkeiten, daß entweder reticuläre Neurone zeitweise feuern oder daß respiratorische Neurone durch die extremen experimentellen Bedingungen ihre Rhythmik verlieren. Auf jeden Fall ist es eine Tatsache, daß isoliertes, akut entnommenes Nervengewebe unmittelbar nach der Entnahme in der Größenordnung von ca. 1,0 mm^3 ohne Afferenzen eine Spontanaktivität hervorbringen kann. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß die Isolation von Nervengewebe bei unserer Methode der Entnahme wesentlich vollständiger war als in den bisherigen Durchtrennungsversuchen und Denervierungsversuchen in situ (ADRIAN und BUYTENDIJK, 1931; EULER und SÖDERBERG, 1952; HUKUHARA, 1973; SALMOIRAGHI und BURNS, 1960 b; HOFF und BRECKENRIDGE, 1949).

Schon SALMOIRAGHI und BURNS (1960 b) stellten selbstkritisch bei ihrer Arbeit fest, "that a major difficulty in the way of interpreting the results of isolation experiments is caused by the uncertainty about injury discharge from severed neurones", und PITTS (1946) zitierend stellen sie fest: "The evidence is of a negative sort, i.e., these stated procedures do not abolish the rhythm of breathing". Neben der Unsicherheit der funktionell wirksamen, vollständigen Durchtrennung stellen die oberflächlichen ventralen Chemoreceptoren (besonders nach Denervation der arteriellen Chemoreceptoren) eine wesentliche Quelle für Afferenzen zu den respiratorischen Neuronen dar (LOESCHCKE, KOEPCHEN, 1958; SCHLAEFKE und LOESCHCKE, 1967; SCHWANGHART et al., 1974). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten ist bei den eigenen Experimenten die Verbindung der ventralen Oberfläche zum respiratorischen Areal unterbrochen. Darum ist es besonders bemerkenswert, daß diese Neurone, seien es reticuläre oder respiratorische, ohne diese Zuflüsse spontanaktivi sein können.

Es wäre die Möglichkeit zu bedenken, daß bei der Entnahme, ähnlich wie bei SALMOIRAGHI und BURNS (1960 b), durch den Entnahmevorgang eine unspezifische Reizung entsteht, die dann mit rhythmischer Aktivität beantwortet wird. Ferner wäre es aber auch beispielsweise möglich, daß der Kaliumfluß aus den geschädigten Zellen zu einer unnatürlichen Erregungsentstehung führen kann und somit ausfallende natürliche Zuflüsse als unspezifische Aktivierung ersetzt. Aber unabhängig davon sind einige Überlegungen gerechtfertigt. Die in 8 Experimenten gefundenen, ziemlich regelmäßigen rhythmischen Salven lassen sich zwangslos als Aktivität respiratorischen Ursprungs interpretieren. Hier-

für spricht zum einen der gute Vergleich mit den Atemfrequenzen von wachen und anästhesierten Ratten gleichen Alters. Dabei hat sich gezeigt, daß die Standardabweichung bei den narkotisierten und operierten Ratten größer war als bei den wachen. Das mag auf die experimentellen Eingriffe und vor allem darauf zurückzuführen sein, daß die ZNS-Empfindlichkeit für das Narkosemittel schwankt, daß die Trachea im Versuchsverlauf verschleimen kann und ein zusätzlicher Widerstand bei der Atmung über die NTC-Pille überwunden werden muß. Die gute Übereinstimmung in der Frequenz kommt wahrscheinlich zufällig zustande, weil sich mehrere Faktoren gegenseitig kompensieren.

Bedingt durch die Relation der großen Entnahmekanüle zur Medullagröße der Ratte waren die meisten Ableitungen erwartungsgemäß multipel. Dadurch können eventuelle rhythmische Ereignisse durch phasenverschobene Aktivitäten oder durch unregelmäßige Aktivitäten als solche unerkannt bleiben. Es wäre also möglich, daß eine große Anzahl rhythmischer Einzelaktivitäten als unrhythmische multiple Aktivität angesehen wurde. Wenn aber andererseits bestimmte rhythmische Salven (aus mehreren Einheiten bestehend) gefunden werden, so setzt das zwangsläufig eine Synchronisation voraus.

Die Experimente beweisen also, daß in dem entnommenen Areal ohne Verbindung zum übrigen pontomedullären respiratorischen Substrat eine autonome Rhythmik möglich ist. Sollte sich die Vermutung bestätigen, daß es sich hierbei um den Ausdruck der physiologischen Tätigkeit der mit unserem Verfahren isolierten Neurone handelt, so macht das alle Modelle, die etwa ein ponto-medulläres Unterzentrum fordern, zweifelhaft, wenn nicht sogar überflüssig. Man ist eher geneigt anzunehmen, daß die Rhythmogenese auf der Basis einer Synchronisation von kleinen Neuronengruppen stattfindet, die in sich selbst zur Rhythmusbildung imstande sind. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen läßt sich nicht entscheiden, ob schon in der Einzelzelle die Fähigkeit der Rhythmusbildung besteht oder ob kleine Zellgruppen mit ihren interneuronalen Verknüpfungen die kleinste zur Autonomie fähige Einheit ist.

Ebenso muß die Frage gegenwärtig offen bleiben, ob in dem entnommenen Gewebszylinder aus dem inspiratorischen Prädilektionsgebiet nicht auch exspiratorische Neurone enthalten waren und somit eine reziproke Innervation doch noch bestehen und eine Grundvoraussetzung für die Rhythmogenese darstellen könn-

te, so wie es in vielen Modellen angenommen wurde (YOUNG, 1966; COHEN, 1969). Die vorliegenden Ergebnisse machen aber die reziproke Verschaltung als Grundvoraussetzung zumindest zweifelhaft, da die zahlenmäßige Relation von abgeleiteten in- zu exspiratorischen Neuronen bei 15:1 lag und da bei der durchgeführten stereotaktischen Lokalisation, übereinstimmend mit KRUSCHE (1977), bei Tieren bis zu dieser Altersgruppe, exspiratorsiche Aktivitäten fast ausschließlich lateral von der inspiratorischen Population gefunden wurden. Es ist ferner erwähnenswert, daß nur selten, und dann kurzdauernde, ausschließlich nicht rhythmische Aktivität bei Nervengewebe aus der Umgebung des respiratorischen Areals zu finden war.

G. ZUSAMMENFASSUNG

1. An 8-17 Tage alten Ratten wurde eine stereotaktische Lokalisation respiratorischer Neurone in der Medulla oblongata mit 10 µ Platin-Quarz-Elektroden durchgeführt.
2. Es konnte eine eindeutige lokale Häufung inspiratorischer Neurone in einer Tiefe von 0,7 mm bis 1,3 mm unter der dorsalen Oberfläche der Medulla oblongata, in einem Gebiet, das sich 0,60 mm bis 1,65 mm lateral der Mittellinie und 1,25 mm caudal bis 0,60 mm rostral des Obex erstreckte, gefunden werden.
3. Exspiratorische Aktivitäten wurden nur vereinzelt gefunden. Das Verhältnis aller abgeleiteten inspiratorischen zu exspiratorischen Aktivitäten lag bei 15:1.
4. Es wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, durch elektrophysiologische Ableitungen während des Einfahrens in das Gewebe und während der Entnahme, bei gleichzeitiger Atemregistrierung, eine zusätzliche funktionelle Kontrolle zu erhalten und Hirngewebe in der Größenordnung von 1,0 mm^3 zu entnehmen.
5. Bei 98 Entnahmen konnten in 30 Versuchen Aktivitäten abgeleitet werden. Davon lagen 8 mit deutlich rhythmischem Entladungsmuster im Frequenzbereich der Atmung wacher und anästhesierter Ratten der gleichen Altersgruppe.

6. Verletzungsentladungen geschädigter Zellen als Ursache für diese Aktivitäten konnten aufgrund der Spikeidentifizierung am Speicher-KO ausgeschlossen werden.

7. In 20 Kontrollversuchen wurde Hirnstammgewebe außerhalb des respiratorischen Areals entnommen, wobei lediglich in 3 Fällen sehr kurzdauernde Aktivität, ohne jede rhythmische Gruppierung, gefunden wurde.

8. 100 Kontrollversuche bei identischer Versuchsanordnung mit leerer Kanüle und mit Hirngewebe nach Entnahme an gleicher Stelle aus dem toten Tier ergaben keine Aktivitäten.

9. Mechanische Artefakte konnten aufgrund der unterschiedlichen Dauer und der abweichenden Verlaufsform von biologischen Aktivitäten mittels Spike-Identifizierung am Speicher-KO ausgeschlossen werden.

10. Die Ergebnisse zeigen, daß ein Teil des respiratorischen Areals nach totaler Isolation in vitro synchronisierte, deutlich rhythmische Salven hervorbringen kann.

11. Die vorausgehende stereotaktische Lokalisation rein inspiratorischer Aktivität, sowie die elektrophysiologische Ableitung während der Entnahme, machen ein vorwiegend inspiratorisches Gewebematerial wahrscheinlich.

12. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse lassen Modelle, die eine reziproke Verschaltung zwischen in- und exspiratorischen Neuronen für die Rhythmusbildung unabdingbar voraussetzen, unwahrscheinlich erscheinen.

13. Das funktionell identifizierte Gewebe wurde nach der Ableitung in vitro der Gewebekultur zugeführt.

14. Es wurden insgesamt 48 Gewebszylinder kultiviert, davon konnten 30 % der Explantate zur Differenzierung gebracht werden.

15. Die differenzierten Kulturen wurden lichtmikroskopisch untersucht.

16. Kulturen, die aufgrund morphologischer Kriterien Neurone enthielten, wurden histologisch mit den Färbungen nach PISCHINGER (Nissl-Färbung) und BODIAN (Neurofibrillenfärbung) aufgearbeitet.

17. Es wurde eine Doppelfärbung entwickelt, die es einmal ermöglichte, Nissl-Schollen darzustellen und im Anschluß daran eine Silberimprägnation nach BODIAN, zur Darstellung der Neurofibrillen, durchzuführen.

18. Mit den histologischen Färbemethoden konnten Nervenzellen im vorher funktionell identifizierten und dann kultivierten respiratorischen Gewebe der 8-17 Tage alten Ratte nachgewiesen werden.

H. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1. Registrierschema	22
Abb. 2. Dorsalansicht der Medulla oblongata einer 13 Tage alten Ratte (Gewicht 26 g)	23
Abb. 3. Schematische Darstellung der kombinierten Ableitung und Entnahme	25
Abb. 4. Neuronale Aktivitäten während des Einfahrens in das Gewebe und bei der Entnahme	28
Abb. 5. Verschiedener Entladungsmuster in vitro	30
Abb. 6.-13. Rhythmische Entladungsmuster	31-35
Abb. 14. Häufigkeitsverteilung der Periodendauern rhythmischer Entladungen in vitro im Vergleich zu den Periodendauern narkotisierter, operierter Tiere und wacher Tiere	43
Abb. 15. Rhythmen 2. Ordnung	44
Abb. 16. Rhythmen 2. Ordnung nach Strychnin-Applikation	44
Abb. 17. Unregelmäßige Entladungsmuster in vitro	45
Abb. 18. Unregelmäßige Entladungsmuster mit Übergang zu kontinuierlich erscheinenden	46
Abb. 19. Aktivitätszunahme nach Strychnin-Applikation	48
Abb. 20. Artefaktdarstellung am Speicher-KO	49
Abb. 21. Einzelspike-Darstellung neuronaler Aktivitäten	49
Abb. 22. Mesenchymatische Zellen	54
Abb. 23. Makrophagen	54
Abb. 24. Fibroblasten	55
Abb. 25. Protoplasmatische Astrozyten	56
Abb. 26. Faseriger Astrozyt	56
Abb. 27. Oligodendrogliazellen	57
Abb. 28. Nervenzelle	58
Abb. 29. Multipolare Nervenzelle	58
Abb. 30. Nervenzelle, gefärbt nach PISCHINGER (Nissl-Färbung)	59
Abb. 31-34. Nervenzellen, gefärbt nach BODIAN (Neurofibrillendarstellung)	60-62

Abb. 35. Nervenzelle, gefärbt nach PISCHINGER 63
Abb. 36. Nervenzelle, gefärbt nach PISCHINGER 63
Abb. 37. Nervenzelle, gefärbt nach BODIAN 64

I. LITERATUR

ADRIAN, E.D. and BUYTENDIJK, F.J.J.: Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish. J.Physiol. (Lond.) 71, 121-135 (1931)

AMASSIAN, V.E. and DEVITO, R.V.: Unit activity in reticular formation and nearby structures. J.Neurophysiol. 17, 575-603 (1954)

BATSEL, H.L.: Localization of bulbar respiratory center by microelectrode sounding. Exper.Neurol. 9, 410-426 (1964)

BATSEL, H.L.: Activity of bulbar respiratory neurons during passive hyperventilation. Exper.Neurol. 19, 357-374 (1967)

BAUMGARTEN, R.v.: Zur Technik der Mikroableitung am pulsierenden Gehirn. Naturwissenschaften 44, 22-23 (1957)

BAUMGARTEN, R.v. und MOLLICA, A.: Der Einfluß sensibler Reizung auf die Entladungsfrequenz kleinhirnabhängiger Reticularzellen. Pflügers Arch.ges. Physiol. 259, 79-96 (1954)

BAUMGARTEN, R.v., BAUMGARTEN, A.v. und SCHAEFER, K.-P.: Beitrag zur Lokalisationsfrage bulboretikulärer respiratorischer Neurone der Katze. Pflügers Arch.ges.Physiol. 264, 217 (1957)

BAUMGARTEN, R.v., BALTHASAR, K. und KOEPCHEN, H.P.: Über ein Substrat atemrhythmischer Erregungsbildung im Rautenhirn der Katze. Pflügers Arch. ges.Physiol. 270, 504-528 (1960)

BAUMGARTEN, R.v. and SALMOIRAGHI, G.C.: Respiratory neurons in the goldfish. Arch.ital.Biol. 100, 31-47 (1962)

BERTRAND, F. and HUGELIN, A.: Respiratory synchronizing function of nucleus parabrachialis medialis: pneumotaxic mechanisms. J.Neurophysiol. 34, 189-207 (1971)

BERTRAND, F., HUGELIN, A. and VIBERT, J.F.: A stereologic model of pneumotaxic oscillator based on spatial and temporal distributions of neuronal bursts. J.Neurophysiol. 37, 91-107 (1974)

BIANCHI, A.L.: Localisation et étude des neurones respiratoires bulbaires. Mise en jeu antidromique par stimulation spinale ou vagale. J.Physiol. (Paris) 63, 5-40 (1971)

BIENFAIT, A.: Recherches sur la physiologie des centres respiratoires. Bull. Acad.roy.Soc.Belg. 62 (3me Sér. 23), 260-268 (1892)

BODIAN, D.: In: Mikroskop.Technik, Ed. Romeis, B. Oldenbourg-Verlag. München - Wien 1968, § 1854 S. 446-447

BRECKENRIDGE, C.G. and HOFF, H.E.: Pontine and medullary regulation of respiration in the cat. Amer.J.Physiol. 160, 385-394 (1950)

BUCHER, K.: Elektrische Aktivität des isolierten, künstlich durchströmten Medulla oblongata-Präparates. Helv.physiol.pharmacol.Acta 3, C34-C35 (1945)

COHEN, M.I.: Discharge patterns of brain-stem respiratory neurons during Hering-Breuer reflex evoked by lung inflation. J.Neurophysiol. 32, 356-374 (1969)

CORNER, M.A. and CRAIN, S.M.: Patterns of spontaneous bioelectric activity during maturation in culture of fetal rodent medulla and spinal cord tissues. J.Neurobiol. 3, 25-45 (1972)

COSTERO, I. and POMERAT, C.M.: Cultivation of neurons from the adult human cerebral and cerebellar cortex. Amer.J.Anat. 89, 405-467 (1951)

CRAIN, S.M.: Development of electrical activity in the cerebral cortex of the albino rat. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 81, 49-51 (1952)

CRAIN, S.M.: Development of bioelectric activity during growth of neonatal mouse cerebral cortex in tissue culture. In: P. Kellaway and I. Petersen (eds.) Symposium: Neurological and electroencephalographic correlative studies. New York: Grune and Stratton 1964, pp. 12-26

CRAIN, S.M.: Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture. Intern.Rev.Neurobiol. 9, 1-42 (1966)

CRAIN, S.M.: Electrical activity of brain tissue developing in culture. In: Basic Mechanisms of Epilepsies. H.H. Jasper, A.A. Ward and A. Pope (eds.). Little, Brown, Boston, Mass. 1969, pp. 506-516

CRAIN, S.M.: Tissue culture models of epileptiform activity. In: Experimental models of epilepsy. D.P. Purpura and J.K. Penry (eds.). Raven Press New York 1972, pp. 291-316

CRAIN, S.M.: Microelectrode recording in brain tissue cultures. In: Methods in physiological psychology. R.F. Thompson (ed.). Vol. I. Bioelectric recording techniques Part A. Academic Press New York - London 1973, pp. 39-75

CRAIN, S.M. and BORNSTEIN, M.B.: Bioelectric activity of neonatal mouse cerebral cortex during growth and differentiation in tissue culture. Exper.Neurol. 10, 425-450 (1964)

CRAIN, S.M. and PETERSON, E.R.: Complex bioelectric activity in organized tissue cultures of spinal cord (human, rat and chick). J.Cell.comp.Physiol. 64, 1-13 (1964)

CRAIN, S.M. and PETERSON, E.R.: Onset and development of functional interneuronal connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture. Brain Res. 6, 750-762 (1967)

CRAIN, S.M., PETERSON, E.R. and BORNSTEIN, M.B.: Formation of functional interneuronal connexions between explants of various mammalian central nervous tissues during development in vitro. In: Growth of the nervous system. A CIBA Foundation Symposium. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor (eds.), Churchill Ltd. London 1968, pp. 13-31

CUNNINGHAM, A.W.B.: Spontaneous potentials from explants of chick embryo medulla oblongata in culture. Naturwissenschaften 48, 104-105 (1961 a)

CUNNINGHAM, A.W.B. and STEPHENS, S.G.: Qualitative effect of strychnine and brucine on spontaneous potentials from explants of telencephalon. Experientia 17, 569-571 (1961 b)

ECCLES, J.C., LLINAS, R. and SASAKI, K.: Parallel fibre stimulation and the responses induced thereby in the Purkinje cells of the cerebellum. Exp. Brain Res. 1, 17-39 (1966)

EISENMANN, J., LANDGREN, S. and NOVIN, D.: Functional organization in the main sensory trigeminal nucleus and in the rostral subvision of the nucleus of the spinal trigeminal tract in the cat. Acta physiol.scand. 59, Suppl. 214, 1-44 (1963)

EULER, C.v. and SÖDERBERG, U.: Medullary chemosensitive receptors. J.Physiol. (Lond.) 118, 545-554 (1952)

FLOURENS, P.: Recherches expêrimentales sur les propriêtês et les fonctions du systême nerveux dans les animaux vertêbrês. Sec. Edit. Paris J.B. Bailliere 1842

FREEMAN, A.R.: Electrophysiological analysis of the actions of strychnine, bicuculline and picrotoxin on the axonal membrane. J.Neurobiol. 4, 567-582 (1973)

GAD, J.: Über automatische und reflectorische Athemcentren. Arch.(Anat.)Physiol. 1886, 388-396 (1886)

GARCIA RAMOS, J.: On the integration of respiratory movements. Acta physiol. lat.-amer. 9, 246-256 (1959)

GEIGER, R.S.: Subcultures of adult mammalian brain cortex in vitro. Exp. Cell Res. 14, 541-566 (1958)

GEIGER, R.S.: The behaviour of adult mammalian brain cells in culture. Intern. Rev.Neurobiol. 5, 1-52 (1963)

GESELL, R. and MOYER, C.: Is breathing fundamentally a reflex phenomenon? Quart.J.exp.Physiol. 25, 13-31 (1935)

HABER, E., KOHN, K.W., NGAI, S.H., HOLADAY, D.A. and WANG, S.C.: Localization of spontaneous respiratory neuronal activity in the medulla oblongata of the cat: a new location of the expiratory center. Amer.J.Physiol. 190, 350-355 (1957)

HALL, M.: Memoirs on the nervous system. London: Sherwood, Gilbert and Piper 1837

HEINBECKER, P. and BARTLEY, S.H.: Manner of strychnine action on nervous system. Amer.J.Physiol. 125, 172-187 (1939)

HERING, H.E.: Über die nach Durchschneidung der hinteren Wurzeln auftretende Bewegungslosigkeit des Rückenmarkfrosches. Pflügers Arch.ges.Physiol. 54, 614-636 (1893)

HEYMANS, J.F. et HEYMANS, C.: Sur les modifications directes et sur la rêgulation rêflexe de l'activitê du centre respiratoire de la tête isolée du chien. Arch.internat.Pharmacodyn. 33, 273-370 (1927)

HILD, W.: Observations on neurons and neuroglia from the area of the mesencephalic fifth nucleus of the cat in vitro. Z.Zellforsch. 47, 127-146 (1957)

HÖSLI, E. and HÖSLI, L.: The presence of acetylcholinesterase in cultures of cerebellum and brain stem. Brain Res. 19, 494-496 (1970)

HÖSLI, E., MEIER-RUGE, W. and HÖSLI, L.: Monoamine-containing neurones in cultures of rat brain stem. Experientia 27, 310-311 (1971)

HOFF, H.E. and BRECKENRIDGE, C.G.: The medullary origin of respiratory periodicity in the dog. Amer.J.Physiol. 158, 157-172 (1949)

HOGUE, M.J.: Tissue cultures of the brain. J.Comp.Neurol. 85, 519-530 (1946)

HOGUE, M.J.: A study of adult human brain cells grown in tissue cultures. Amer.J.Anat. 93, 397-427 (1953)

HUGELIN, A. and BERTRAND, F.: Organization of the pneumotaxic oscillator in the cat. Acta Neurobiol.Exptl. 33, 275-286 (1973)

HUKUHARA, T.: Neuronal organization of the central respiratory mechanisms in the brain stem of the cat. Acta Neurobiol.Exptl. 33, 219-244 (1973)

HUKUHARA, T., NAKAYAMA, S., BABA, S. and ODANAKA, T.: On the localization of the respiratory center. Jap.J.Physiol. 2, 44-49 (1951)

HUKUHARA, T. and OKADA, H.: On the automaticity of the respiratory centers of the catfish and crucian carp. Jap.J.Physiol. 6, 313-320 (1956)

KIRKPATRICK, D.B. and KRUGER, L.: Physiological properties of neurons in the principal sensory trigeminal nucleus of the cat. Exper.Neurol. 48, 664-696 (1975)

KNOLL, P.: Beiträge zur Lehre von der Athmungsinnervation. Sechste Mittheilung. Zur Lehre vom Einfluß des centralen Nervensystems auf die Athmung. S.-B.Akad.Wiss. Wien 92, 328-344 (1886)

KOEPCHEN, H.P. und HEINICH, L.: Eine Methode zur fortlaufenden Registrierung von Aktionspotentialen und Aktionspotential-Frequenzen mit mechanischen Direktschreibsystemen. Pflügers Arch.ges.Physiol. 280, 92 (1964)

KOEPCHEN, H.P. und LANGHORST, P.: Verbessertes Verfahren zur Einführung "reitender" Mikroelektroden ins Gewebe. Pflügers Arch.ges.Physiol. 294, 65-67 (1967)

KOEPCHEN, H.P., KLOSSENDORF, D. and PHILIPP, U.: The discharge pattern of expiratory neurons during various states of apnea. Pflügers Arch.ges. Physiol. 319, R51 (1970)

KRUSCHE, N.: Dissertation, Berlin 1977, in Vorbereitung

LANGENDORFF, O.: Der Einfluß des Nervus vagus und der sensiblen Nerven auf die Athmung. Mittheil. Königsberg. Physiol. Lab. (W.v.Wittich) pp. 33-67, Königsberg: Hartung 1878

LANGENDORFF, O.: Über die Selbststeuerung der Athembewegungen. Arch.(Anat.) Physiol. 1879 (Suppl.), 48-53 (1879)

LANGENDORFF, O.: Studien über die Innervation der Athembewegungen. Achte Mittheilung. Die Automatie des Athemcentrums. Arch.(Anat.)Physiol. 1887, 285-289 (1887)

LE GALLOIS, C.J.J.: Expériences sur le principe de la vie, notamment sur celui des mouvemens du cœur, et sur le siége de ce principe. Paris: D'Hautel 1812

LEWANDOWSKY, M.: Die Regulierung der Athmung. Arch.(Anat.)Physiol. 1896, 195-248, 483-510 (1896)

LOESCHCKE, H.H. und KOEPCHEN, H.P.: Beeinflussung von Atmung und Vasomotorik durch Einbringen von Novocain in die Liquorräume. Pflügers Arch.ges.Physiol. 266, 611-627 (1958)

LUMSDEN, T.: Observations on the respiratory centers in the cat. J.Physiol. (Lond.) 57, 153-160 (1923 a)

LUMSDEN, T.: Observations on the respiratory centers. J.Physiol. (Lond.) 57, 354-367 (1923 b)

LUMSDEN, C.E.: Nervous tissue in culture. In: The Structure and Function of Nervous Tissue. G.H. Bourne (ed.). Academic Press, New York and London 1968, S. 80-81

MARCKWALD, M.: Die Athembewegungen und deren Innervation beim Kaninchen. Z.Biol. 23, 149-283 (1887)

MARCKWALD, M. und KRONECKER, H.: Über die Auslösung der Athembewegungen. Arch. (Anat.)Physiol. 1880, 441-446 (1880)

McCOY, T.A., MAXWELL, M. and KRUSE, P.F.: Amino acid requirements of the Novicoff hepatoma in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100, 115-118 (1959)

MERRILL, E.G.: The lateral respiratory neurons of the medulla oblongata: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambigualis the spinal accessory nucleus and the spinal cord. Brain Res. 24, 11-28 (1970)

MÖLLER, J.: Handbuch der Physiologie des Menschen für Vorlesungen. Zweiten Bandes erste Abtheilung. Coblenz: J. Hölscher (1837)

MURRAY, M.R.: In: Cells and Tissues in Culture. E.N. Willmer (ed.). Academic Press, New York 1965, Vol. 2, Chap. 9, p. 373

NELSON, J.R.: Single unit activity in medullary respiratory centers of cat. J.Neurophysiol. 22, 590-598 (1959)

OKAMOTO, M.: Observations on neurons and neuroglia from the area of the reticular formation in tissue culture. Z.Zellforsch. 47, 269-287 (1958)

ONDINA, D.M., YAMAMOTO, W.S. and MASLAND, W.S.: Respiratory centers in the albino rat. Amer.J.Physiol. 198, 389-392 (1960)

PHILIPP, U.: Die exspiratorische Neuronenpopulation im unteren Hirnstamm des Hundes: Lokalisation, Abgrenzung und funktionelle Beziehungen. Inauguraldissertation, Berlin 1973

PHILIPP, U. und KLOSSENDORF, D.: Lokalisation und Abgrenzung einer geschlossenen, exspiratorisch tätigen Neuronenpopulation im unteren Hirnstamm des Hundes. Pflügers Arch.ges.Physiol. 312, 57 (1969)

PISCHINGER, A.: In: Mikroskop. Technik. B. Romeis (ed.), Oldenbourg-Verlag München - Wien 1968, § 1786, S. 424

PITTS, R.F.: Organization of the respiratory center. Physiol.Rev. 26, 609-630 (1946)

PITTS, R.F., MAGOUN, H.W. and RANSON, S.W.: Interrelations of the respiratory centers in the cat. Amer.J.Physiol. 126, 689-707 (1939 a)

PITTS, R.F., MAGOUN, H.W. and RANSON, S.W.: The origin of respiratory rhythmicity. Amer.J.Physiol. 127, 654-670 (1939 b)

POLSTER, J. and KOEPCHEN, H.P.: Coordination among brain stem respiratory and cardiovascular rhythms. Excerpta Medica: Intern.Congr.Ser. 48, 169 (1962)

POMERAT, C.M. and COSTERO, I.: Tissue cultures of cat cerebellum. Amer.J. Physiol. 99, 211-247 (1956)

PROVINE, R.R.: Ontogeny of bioelectric activity in the spinal cord of the chick embryo and its behavioral implications. Brain Res. 41, 365-378 (1972)

PROVINE, R.R., SHARMA, S.C., SANDEL, T.T. and HAMBURGER, V.: Electrical activity in the spinal cord of the chick embryo, in situ. Proc.Natl.Acad. Sci. 65, 508-515 (1970)

RAMÓN-MOLINER, E.: The morphology of dendrites. In: The Structure and Function of Nervous Tissue. G.H. Bourne (ed.). Academic Press, New York and London 1968. S. 232-233, S. 240-241

ROSENTHAL, J.: Die Athembewegungen und ihre Beziehung zum Nervus vagus. Berlin: August Hirschwald 1862

ROSENTHAL, J.: Studien über Athembewegungen. Zweiter Artikel. Arch.Anat.Physiol.wiss.Med. 1865, 191-203 (1865)

SALMOIRAGHI, G.C. and BURNS, B.D.: Localization and patterns of discharge of respiratory neurons in brain-stem of cat. J.Neurophysiol. 23, 2-13 (1960 a)

SALMOIRAGHI, G.C. and BURNS, B.D.: Notes on mechanism of rhythmic respiration. J.Neurophysiol. 23, 14-26 (1960 b)

SCHEIBEL, M., SCHEIBEL, A., MOLLICA, A. and MORUZZI, G.: Convergence and interaction of afferent impulses on single units of reticular formation. J.Neurophysiol. 18, 309-331 (1955)

SCHIFF, J.M.: Lehrbuch der Muskel- und Nervenphysiologie. Lahr: M. Schauenburg & Co. 1858/59

SCHLAEFKE, M.E. und LOESCHCKE, H.H.: Lokalisation eines an der Regulation von Atmung und Kreislauf beteiligten Gebietes an der ventralen Oberfläche der Medulla oblongata durch Kälteblockade. Pflügers Arch.ges.Physiol. 297, 201-220 (1967)

SCHLAPFER, W.T., MAMOON, A.M. and TOBIAS, C.A.: Spontaneous bioelectric activity of neurons in cerebellar cultures: evidence for synaptic interactions. Brain Res. 45, 345-363 (1972)

SCHOTT, A., WARTA, H., MENGEL, E., KRUSCHE, N. and KOEPCHEN, H.P.: Finer localization of inspiratory and expiratory neurons in the lower brainstem of rat. Pflügers Arch.ges.Physiol. 335, R38 (1972)

SCHOTT, A., STROH, N., HOFMANN, F. and REISS, B.: A stable, quartz-coated platinum microelectrode, simple in manufacturing. In Vorbereitung

SCHWANGHART, F., SCHRÖTER, R., KLOSSENDORF, D. and KOEPCHEN, H.P.: The influence of novocaine block of superficial brain stem structures of respiratory and reticular neurons. In: W. Umbach and H.P. Koepchen (eds.). Central Rhythmic and Regulation. Stuttgart: Hippokrates Verlag 1974, p. 104

SEGUNDO, J.P., TAKENAKA, T. and ENCABO, H.: Somatic sensory properties of bulbar reticular neurons. J.Neurophysiol. 30, 1221-1238 (1967)

SOUKUPOVÁ, M. and HOLECKOVÂ, E.: The latent period of explanted organs of newborn, adult and senile rats. Exper.Cell Res. 33, 361-367 (1964)

VOLKMANN, A.W.: Ober die Bewegungen des Athmens und Schluckens mit besonderer Berücksichtigung neurologischer Streitfragen. Arch.Anat.Physiol.wiss. Med. 1841, 332-360 (1841)

WANG, S.C., NAGAI, S.H. and FRUMIN, M.J.: Organization of the central respiratory mechanism in the brain stem of the cat: genesis of normal respiratory rhythmicity. Amer.J.Physiol. 190, 333-342 (1957)

YOUNG, A.C.: Neuronal control of respiration. In: Physiology and Biophysics. T.C. Ruch and H.D. Patton (eds.). W.B. Sounders Company, Philadelphia and London 1966, Chap. 41, pp. 788-802

Herrn Professor Dr. A. Schott und Herrn Professor Dr. H.P. Koepchen sei für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeiten zur Durchführung der Experimente und für die Diskussion der Arbeit gedankt.

Fräulein B. Reiss möchte ich für die intensive und selbstlose Zusammenarbeit sowie die Beratung auf dem Gebiet der Gewebekultur aufs herzlichste danken.

Außerdem möchte ich Herrn N. Stroh für die technische Zusammenarbeit und Beratung danken.

Ich danke ferner Herrn H. Dannenberg für die Anfertigung technischer Geräte, Herrn F. Hofmann für die Herstellung der Platin-Quarz-Elektroden, Herrn P. Wiesatty für die Züchtung der Ratten, Herrn P. Holzner für die fotografischen Arbeiten, Fräulein M. Schindler für die Anfertigung technischer Zeichnungen und Fräulein E. Gaebel für das Schreiben der Arbeit.

Lebenslauf

Am 26.1.1943 wurde ich als Sohn des Binnenschiffers Johann Benstein und seiner Ehefrau, der Stenotypistin Margarethe, geb. Hass, in Minden geboren.

Von 1949 bis 1955 besuchte ich die Volksschule am Pulverberg in Bremen und im Anschluß daran bis 1958 die Hauptschule an der Schleswigerstraße. Im gleichen Jahr begann ich die Lehre als Stahlbauschlosser, die ich 1961 abschloß. Während der Lehrzeit besuchte ich Vorbereitungskurse für die Ingenieurschule, die ich mit dem Abschluß der Berufsaufbauschule beendete. Bis 1965 war ich in Bremen als Maschinenbauer und Werkzeugmacher tätig. Ende August 1965 begann ich den Besuch des Berliner Abendgymnasiums, das ich 1968 mit der Reifeprüfung abschloß. Im darauffolgenden Jahr begann ich das Studium der Humanmedizin. Nach dem Staatsexamen im Jahre 1975 war ich als Medizinalassistent am Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin, an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Kulmbach und an der Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Naila tätig. 1976 begann ich die Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin in Naila.